

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE PRRS (PORCINE
REPRODUCTIVE & RESPIRATORY SYNDROME) EM
PORTUGAL CONTINENTAL E AVALIAÇÃO DE *KITS* DE
DIAGNÓSTICO**

Inês Isabel Belo da Cruz

Mestrado em Microbiologia Aplicada

ANO 2013/2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE PRRS (PORCINE
REPRODUCTIVE & RESPIRATORY SYNDROME) EM
PORTUGAL CONTINENTAL E AVALIAÇÃO DE *KITS* DE
DIAGNÓSTICO**

Dissertação orientada por:

Orientador Externo: Professor Doutor Rui Perestrelo Vieira

Orientador Interno: Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

Inês Isabel Belo da Cruz

Mestrado em Microbiologia Aplicada

ANO 2013/2014



IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE PRRS (PORCINE REPRODUCTIVE & RESPIRATORY SYNDROME) EM PORTUGAL CONTINENTAL E AVALIAÇÃO DE *KITS* DE DIAGNÓSTICO

Inês Isabel Belo da Cruz

2013/2014

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no SOCLAB Laboratório, Análises Laboratoriais Lda., sob a orientação direta do Professor Doutor Rui Perestrelo Vieira no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

A todos os que de uma forma direta e indireta me apoiaram, me aconselharam, me incentivaram na concretização desta Dissertação de Mestrado, uma etapa importante na minha vida profissional, expresso o meu sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Rui Perestrelo, por ter aceitado ser meu orientador externo na Dissertação. Pela amizade, carinho, paciência que teve ao longo deste tempo para comigo. Pelo apoio e força que sempre me deu, e por ter estado sempre nas alturas mais críticas em que a vontade de desistir era mais que muita, o cansaço pesava e ali estava com as suas sábias palavras para me fazer continuar. Espero poder sempre e ao longo de muitos anos aprender tudo o que tem para ensinar.

À Professora Doutora Maria Filomena Caeiro, por ter aceitado ser minha orientadora interna na Dissertação. Obrigado por tudo o que aprendi, pelo tempo que me dispensou, pela paciência que teve comigo, pelos ensinamentos que me transmitiu.

Ao meu marido e á minha filha Maria Inês pelas horas que dispensaram da minha companhia, pelo apoio que sempre me deram e pelas palavras amorosas e carinhosas, e a força nas horas mais críticas. Ao meu marido em especial um obrigado pela força para eu não desistir e para continuar, e pelo facto de ter estado e estar sempre a meu lado.

Aos meus pais por me terem ajudado nesta etapa, por me terem apoiado e sobretudo por terem ajudado e tentado compensar a falta de tempo do meu último ano. Sobre tudo ao meu pai porque sempre me incentivou para estudar um pouco mais.

Á minha irmã Mariana pelo apoio e ajuda ao longo da elaboração da tese.

Aos meus amigos e conhecidos pelas vezes em que não fui muito paciente, e nem sempre estive lá como é habitual, obrigado pela compreensão.

Ao laboratório SOCLAB, ao Eng. Nuno, Dr. Sales e Dr. Pedro, à Dr^a Dora, Dr^a Isabel, Dr^a Beta, assim como aos meus colegas obrigado pela paciência que tiveram comigo nos dias menos bons, e pelas dúvidas que esclareceram sempre que necessário!

A Todos um especial Obrigado, do fundo do coração!

RESUMO

PRRS (Porcine reproductive & respiratory syndrome) é uma doença com elevado impacto económico pelo que é imperativo o seu rápido e preciso diagnóstico. A rápida e permanente evolução genética do vírus PRRS complica um diagnóstico preciso e concreto originando muitas vezes resultados falsos negativos.

Deste modo, este trabalho teve como principal objetivo a análise de 200 amostras de soro de suíno colhido no território continental, provenientes de reprodutoras e descendência de diferentes idades (entre as 4 e as 24 semanas) por forma a verificar a prevalência da doença em Portugal Continental, e consequentemente verificar qual o *kit* ELISA comercial que apresenta resultados com maior precisão e sensibilidade.

Estas amostras foram inicialmente analisadas pelo método ELISA. Cada amostra foi analisada individualmente com três *kits* comerciais diferentes de ELISA indireto – *Kit* ELISA HerdCheck PRRS X3 (Laboratórios IDEXX), *kit* ELISA Civtest Suis E/S para deteção de vírus PRRS estirpe Europeia e *kit* ELISA Civtest suis A/S (Laboratórios Hipra) para deteção da estirpe Americana.

Após análise das amostras de soro suíno, foram elaborados *pools* de 5 soros por forma a realizar a identificação do RNA do vírus PRRS (PRRSV) nas amostras, pelo método de PCR em tempo real (RT-PCR), e de seguida avaliar os resultados dos diferentes *kits* ELISA de diagnóstico comerciais utilizados.

Como resultados do ensaio realizado, verificou-se que PRRSV Estirpe Europeia apresentou maior presença que a estirpe Americana no território Continental. Constatou-se que o *kit* IDEXX HerdCheck PRRS X3 apresentou maior sensibilidade para a deteção do vírus do que o *kit* Civtest suis. Observou-se que na realização de *pools* de amostras, o nº de soros que é incluído em cada *pool* influencia diretamente a sensibilidade do teste e verificou-se que a análise realizada por RT-PCR apresentou maior sensibilidade para a deteção de PRRSV do que por ELISA, contudo o teste de RT-PCR não realiza a diferenciação entre PRRSV doença e o PRRSV Vacinal.

ABSTRACT

PRRS (Porcine reproductive & respiratory syndrome) is a disease with high economic impact, therefore it is imperative that the disease's diagnosis is rapid and accurate. The rapid genetic evolution of the PRRS virus complicates the process of obtaining a precise and specific diagnosis, often leading to false negative results.

Thus, the principal objective of this work is the analysis of 200 serum samples collected from pigs in the Portuguese mainland territory, from breeding and offspring of different ages (between 4 and 24 weeks), in order to assess the prevalence of the disease in Portuguese mainland territory, and thus verify which of the commercial ELISA results has a greater accuracy and sensitivity.

These samples were initially analyzed by ELISA. Each sample was analyzed individually with three different commercial ELISA *kits* - HerdCheck PRRS X3 ELISA *kit* (IDEXX Laboratories), *kit* ELISA CIVTEST Suis E/S for detection of PRRS virus' European strain and *kit* CIVTEST Suis ELISA A/S (Hipra Laboratories) for detection of the American strain.

After analyzing samples of swine serum, we grouped them in *pools* of 5, in order to perform the identification of PRRSV (PRRS virus) RNA in the samples by Real time PCR analysis (RT-PCR), and then evaluate the different commercial ELISA *kits* used in diagnostic.

As a result of the performed essay, we verified that the European strain of PRRSV had a higher presence than the American strain in the Portuguese continental territory. Additionally, we stated that the IDEXX HerdCheck PRRS X3 *kit* presented a higher sensibility for the detection of the virus than the CivTest suis *kit*. We still stated that regarding the size of the sample *pool* in RT-PCR essays, the number of serums included in each pool, influenced directly in the test sensibility, and also we verified that the analysis performed through RT-PCR presented higher sensibility in the detection of PRRSV than by ELISA method, nevertheless the RT-PCR test didn't distinguished between PRRSV disease originated and PRRSV originated by vaccines.

ÍNDICE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

% - Percentagem

A/S – Estirpe Americana (*American Strain*)

EAV – Vírus da Arterite Equina (*Equine arteritis vírus*)

ELISA – Ensaio imuno enzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

E/S – Estirpe Europeia (*European Strain*)

EUA – Estados Unidos América

FAT – Teste de anticorpos fluorescentes (*fluorescent antibody test*)

GP – Glicoproteína

HRPO – Peroxidase (*Horseradish peroxidase*)

IHQ – Teste imuno-histoquímico (*Imuno histochemical test*)

IFA – Imunofluorescência indireta (immunofluorescent antibody)

INE – Instituto Nacional de Estatística

IPMA – Ensaio imunoperoxidase (*Immune peroxidase assay*)

LDV – Vírus que eleva a lactato desidrogenase (*Lactate Dehydrogenase elevating vírus*)

mRNA – RNA (ácido Ribonucleico) mensageiro (*Messenger Ribonucleic acid*)

MSD – Doença misteriosa suína (*Mystery Swine Disease*)

nm – Nanómetro

NTRs – regiões não traduzidas (*non-translated regions*)

NUTS - Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

OIE – Organização Mundial para a saúde animal (*World Organization for Animal Health*)

ORF – Grelha de leitura aberta (*Open reading frame*)

PAMs – Macrófagos alveolares suínos (*Pig alveolar macrophages*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

Pool – Conjunto de amostras

Pp - Poliproteína

PRRS – Doença Reprodutiva e Respiratória Suína (*Porcine Reproductive & Respiratory syndrome*)

PRRSV – Vírus da doença Reprodutiva e Respiratória Suína (*Porcine Reproductive & Respiratory syndrome vírus*)

PRRSV-A – Vírus estirpe Americana da doença Reprodutiva e Respiratória Suína (*Porcine Reproductive & Respiratory syndrome vírus American type*)

PRRSV-E - Vírus estirpe Europeia da doença Reprodutiva e Respiratória Suína (*Porcine Reproductive & Respiratory syndrome vírus European type*)

rpm – Rotações por minuto

RNA – Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time Polymerase chain reaction*)

SHFV – Vírus da febre hemorrágica Símia (*Simian hemorrhagic Fever Virus*)

Sg – sub genómico

VNT – Teste de Neutralização Vírica (*Viral neutralization test*)

TMB – Tetrametilbenzidina

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE	vi
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 ETIOLOGIA	3
1.2.1 ESTRUTURA E EXPRESSÃO DO GENOMA	3
1.2.2 CICLO DE INFECÇÃO DE UM <i>ARTERIVIRIDAE</i>	5
1.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA.....	6
1.4 SINAIS CLÍNICOS.....	7
1.5 DIAGNÓSTICO.....	8
1.5.1 ISOLAMENTO DO VÍRUS	9
1.5.2 DETEÇÃO DO VÍRUS	9
1.5.3 DETEÇÃO DO ÁCIDO NÚCLEICO DO VÍRUS.....	10
1.5.4 DETEÇÃO DE ANTICORPOS NO SORO	11
1.5.5 NEUTRALIZAÇÃO VÍRICA.....	12
1.6 CONTROLO	12
Parte II – Trabalho Experimental	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 AMOSTRAS.....	14
2.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	15
2.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS PELA TÉCNICA ELISA.....	15
2.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR RT-PCR	16
2.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA.....	16
2.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO RNA VIRAL POR RT-PCR.....	17
3. RESULTADOS	17
4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	24
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
7. ENDEREÇOS CONSULTADOS.....	35

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

A PRRS (Porcine Reproductive & Respiratory syndrome) é uma doença infetocontagiosa, específica dos suínos, que surgiu no final dos anos 80 nos Estados Unidos da América. Na década de 90 chega também à Europa, e encontra-se atualmente presente na maior parte dos países produtores de suínos.

Os sintomas desta doença não conhecida foram reportados primeiramente em 1987 nos Estados Unidos da América (Keffaber K, 1992) e mais tarde no Canadá em 1988 (Perestrelo Vieira, 1998).

A doença surgiu primeiramente em grupos de suínos no Estado da Carolina do Norte, e os efeitos da doença incluíam perdas reprodutivas severas, pneumonias extensas manifestadas pós desmame, redução de taxas de crescimento e aumento da mortalidade (H, 1990). No princípio, por falta de conhecimento das causas, a doença foi intitulada de “MSD – Mystery Swine Disease”.

Inicialmente a doença MSD foi associada a várias etiologias incluindo os vírus da Encefalomiocardite, Peste suína clássica, Enterovírus suíno, Parvovírus suíno e ADVgE (doença de Aujeszky), as bactérias *Leptospira interrogans serovar Bratislava* e *Chalimydia psittaci*, e a contaminações da ração com micotoxinas (Bane DP, 1990) (DC, 1990) (Joo HS, 1990) (HS, 1988) (T., 1989) (R., 1989). No Canadá foi isolado um novo subtipo de vírus Influenza A, que por sua vez foi associado à lista de possíveis etiologias descritas para descrever a doença de MSD (Dea S B. R., 1992a) (Elazhary Y, 1992), para os leitões que sofriam de doença respiratória severa.

Na Europa, surtos clínicos similares à MSD, foram reportados pela primeira vez em Novembro de 1990, perto de Münster na Alemanha (OIE, 1992). A doença espalhou-se rapidamente, tendo sido documentados 3000 surtos na Alemanha em Maio de 1991.

No entanto, não foram encontradas ligações entre os surtos da doença na Alemanha e os surtos de MSD nos Estados Unidos da América (J, 2003). Mais tarde, em Janeiro de 1991, a doença foi reportada na Holanda, e em Março do mesmo ano na Bélgica (OIE, 1992).

Em Espanha, o primeiro caso clínico foi detetado em Janeiro de 1991, associado com a importação de suínos vivos (Plana DuranJ, 1992), seguindo-se outros três casos, dos

quais dois foram relatados na província de Huesca, e um na província de Lérida, e todos os animais foram rapidamente abatidos.

Em Março de 1991 a União Europeia tomou medidas de forma a tentar limitar a extensão da doença (Directiva comunitária, 1991), e estas medidas consistiram sobretudo num recenseamento dos animais infetados pela doença, e no controlo dos movimentos dos animais a partir das explorações infetadas, por forma a evitar o alastramento da doença. Contudo, as medidas tomadas não se mostraram eficazes tendo a doença surgido pela primeira vez na Grã-Bretanha em Maio de 1991 (Edwards S, 1992), e no final de Outubro de 1991 já tinham sido confirmados 58 novos casos. Na França, os primeiros casos surgiram em Brittany em Novembro de 1991 (Baron T, 1992), seguindo-se a Dinamarca em Março de 1992 (Botner A, 1994), tendo os dispositivos Europeus sido levantados no início de 1993.

A doença manifestou-se também na Polónia em 1992 (Pejsak Z, 1996) e na República Checa em 1995 (Valiček L, 1997).

Na Ásia, a doença manifestou-se no Japão em 1988 (Hirose O, 1995), e na Tailândia em 1991 (Chang CC, 1993). Adicionalmente a pandemia foi espalhada para todos os centros de produção suinícola do Mundo num espaço muito curto de tempo.

Até ao ano de 1991 a falta de um agente etiológico específico levou à designação da doença através de termos “coloridos” e descritivos da doença, apenas baseados em sinais clínicos, sendo que nenhum deles, na ausência de uma causa definida podiam ser considerados inapropriados ou incorretos.

O vírus “MSD” (PRRS) foi considerado como o agente gerador de doenças reprodutivas e respiratórias em suínos. A infeção provocava um conjunto de sintomas em todas as categorias de animais, caracterizando-se pelos abortos ocorridos na última fase da gestação, assim como a mortalidade neonatal e mortalidade perinatal, associadas a um síndrome gripal com anorexia, seguida de ligeira hipertermia e dispneia.

Em 1991 o agente etiológico de PRRS foi isolado a partir de um feto abortado (Wensvoort G, 1991). Através do vírus isolado foi possível reproduzir experimentalmente a doença, de acordo com os postulados de Koch no Instituto Veterinário Central da Holanda (Kreutz, 1998). O Vírus foi denominado de “Lelystad vírus” em virtude da cidade onde se localizava o Instituto (Wensvoort G, 1991).

O vírus Lelystad foi isolado a partir de um conjunto de leitões infetados e inoculado em condições experimentais em porcas gestantes, no período final da gestação (84º dia),

tendo reproduzido grande parte dos sinais clínicos observados em campo, tais como: anorexia, cianose fugaz das orelhas, dificuldade respiratória, hipertermia, abortos, partos com leitões nados – mortos ou mumificados e mortalidade dos jovens leitões com menos de uma semana (Terpstra C, 1991). A estirpe de vírus Lelystad isolada, embora sendo semelhante à estirpe isolada nos EUA (VR-2332), era geneticamente diferente.

1.2 ETIOLOGIA

Segundo Eric J. Snijder et al. (2013) (Eric J. Snijder 1. M., 2013), há cerca de 15 anos atrás, os vírus da família *Arteriviridae* encontravam-se agrupados com os vírus da família *Coronaviridae*, na ordem *Nidovirales* (Cavanagh, 1997).

Apesar das diferenças no tamanho do genoma e estrutura do virião, bem como ao nível da organização e da expressão do genoma, as famílias *Coronaviridae* e *Arteriviridae* eram muito semelhantes. Os vírus de ambas as famílias realizavam a replicação da mesma forma e mostravam a existência de um ancestral comum (Den Boon, 1991).

Uma característica proeminente dos nidovírus ocorre na expressão do genoma e consiste na produção de um conjunto aninhado de RNA mensageiros subgenômicos (sg) que serviram de base para o nome da ordem *Nidovirales* (nidus Latina = ninho).

1.2.1 ESTRUTURA E EXPRESSÃO DO GENOMA

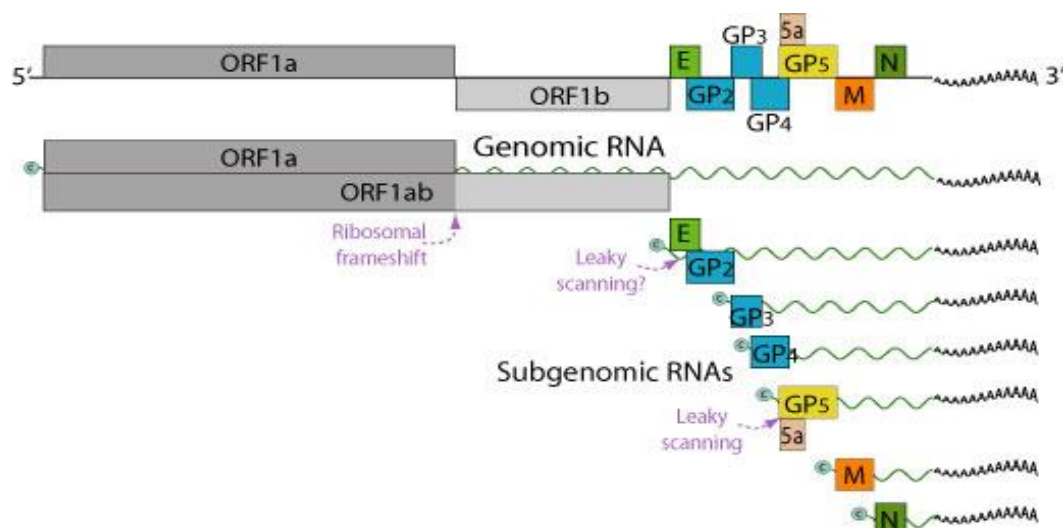


Figura 1 -Genoma dos vírus da família *Arteriviridae*: RNA genômico e RNAs subgenômicos de cadeia simples e polaridade positiva, poliadenilados na extremidade 3' e com CAP na extremidade 5' (Hulo C, 2011) (Eric J. Snijder M. K., 2013).

O genoma dos vírus da família *Arteriviridae* é um genoma de RNA polaridade positiva (Fig.2) com regiões não traduzidas (NTRs) nas regiões 5' e 3', com 156-224 e 59-117

nucleótidos respetivamente, que flanqueiam um conjunto de 10 a 15 ORFs (grelhas de leitura aberta) conhecidas.

As replicases são codificadas nas ORFs 1a e 1b, que ocupam $\frac{3}{4}$ do genoma ou seja 12000 nucleótidos, sendo a dimensão da ORF 1a mais variável do que a dimensão da ORF1b. A tradução da ORF 1a produz uma poliproteína, enquanto a poliproteína da ORF 1ab expressa-se através de *frameshifting* (Den Boon, 1991).

Estas ORFs 1a e 1b codificam proteínas não estruturais que participam na transcrição e replicação do RNA, incluindo a polimerase de RNA (Luque, 2006). A região genómica 3' possui entre 8 a 12 genes, que codificam para a única proteína da Nucleocápside – proteína N, e seis proteínas do invólucro designadas por – E, GP2, GP3, GP4 GP5 e a proteína da matriz (M).

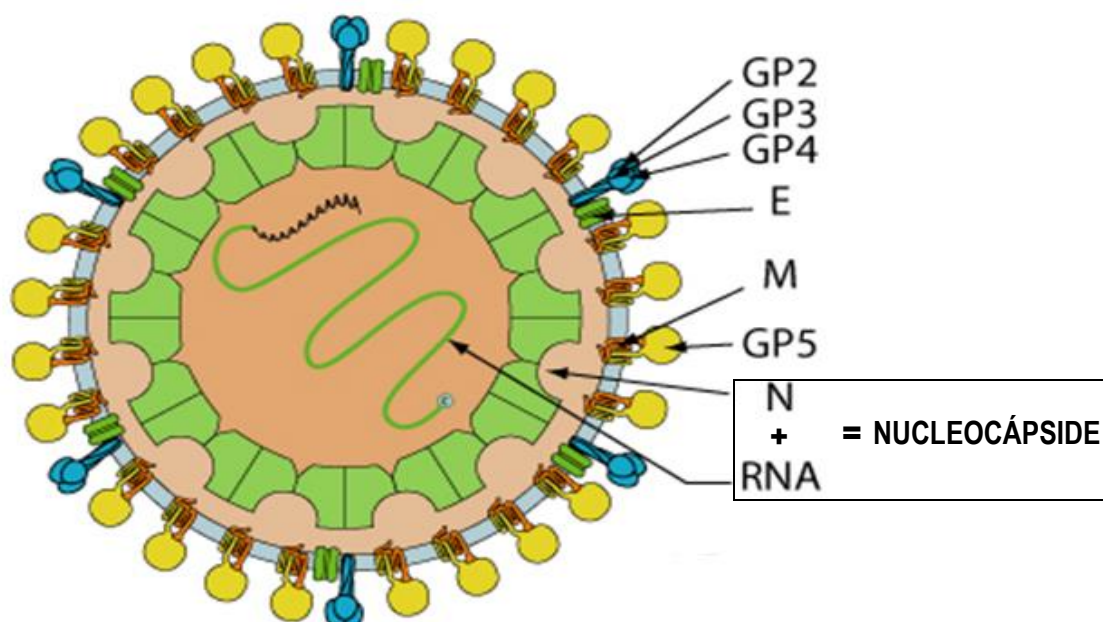


Figura 2 – Virião com cerca de 45 a 60 nm de diâmetro é composto por um núcleo isométrico de 20 a 30 nm, envolto por um invólucro lipídico. O genoma de RNA associa-se com a proteína N para formar a Nucleocápside (NC) (Hulo C, 2011).

A variação no tamanho da ORF1a explica a diferença no tamanho do genoma entre os diferentes *Arterivírus*.

As restantes ORFs que constituem o genoma codificam para as proteínas que formam o virião, ORFs 2 a 7 (Wu WH F. Y.-b.-H., 2001) (Snijder EJ, 1998).

O protótipo do vírus Americano é relacionado com o vírus isolado na Europa, diferindo entre si em cerca de 40 % nas sequências dos aminoácidos (Kousuke H, 2005).

Existem diferenças genéticas e antigênicas significativas entre as estirpes tipo Americana e tipo Europeia, tendo sido a estirpe Americana (denominada de PRRSV-A) a que apresenta maior prevalência nos EUA e continente Asiático, e a estirpe Europeia (PRRSV-E), aquela com maior prevalência na Europa (Eric J. Snijder M. K., 2013).

A elevada variabilidade genética do vírus PRRS está diretamente relacionada com os fenómenos de aquisição e perda de virulência (Allende R L. T., 2000), tendo sido determinado que a ORF 5 é aquela que sofre maior variação devido a apresentar seis locais potencialmente antigênicos (Luque, 2006).

Assim sendo, a variabilidade genética da ORF 5 pode determinar a perda ou alteração de alguns epítomos neutralizantes (Weiland E, 1999). Rowland *et al*, (1999) descreveu que com a estirpe Americana ATCC-VR-2332 ocorriam variações na GP5 e estas provocavam mudanças no reconhecimento dos epítomos de neutralização do vírus (Luque, 2006) (Rowland RR, 1999).

1.2.2 CICLO DE INFEÇÃO DE UM ARTERIVIRIDAE

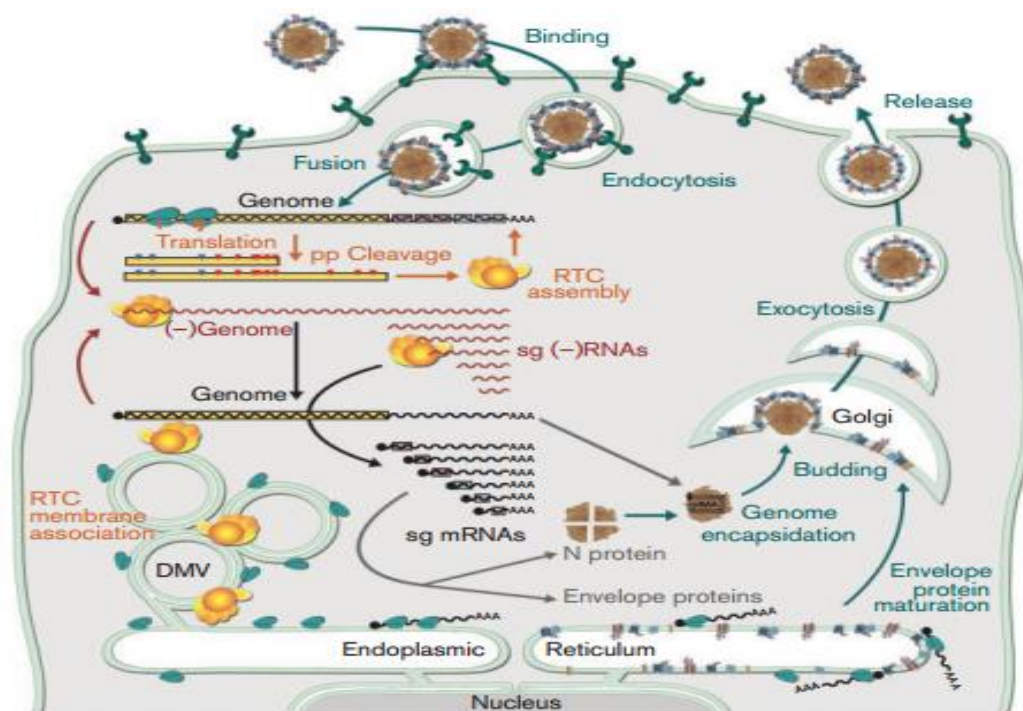


Figura 5 – Resumo do ciclo de infecção dos Arteriviridae (Eric J. Snijder M. K., 2013).

No ciclo de infeção de um *Arteriviridae*, a partícula viral entra na célula hospedeira por endocitose e em seguida, dependendo de abaixamento do pH, ocorre a fusão da membrana do endossoma com o invólucro viral e consequente libertação da Nucleocápside no citosol. Em seguida, a tradução do genoma produz as poliproteínas pp1a e pp1ab que integram a replicase. Estas poliproteínas são auto-clivadas. As proteínas virais não estruturais vão originar o complexo de transcrição e replicação (RTC – RTC) associado a membranas, que começa por sintetizar cadeias de RNA complementar (de sentido negativo). Tanto cadeias de RNA complementar completas como de menor dimensão são produzidas, sendo as últimas o modelo para a síntese dos mRNA subgenómicos (sg) necessários à expressão das proteínas estruturais, que são codificadas na região 3' do genoma. Os novos genomas são incluídos em nucleocápsides, que por sua vez são envolvidas em membranas intracelulares, e finalmente, após a libertação dos viriões para a via de secreção, estes são transportados para a membrana plasmática e libertados por exocitose (Eric J. Snijder 1. M., 2013).

Os recetores da maioria dos *Arteriviridae* são incaracterísticos, contudo os potenciais recetores envolvidos na ligação e passagem da partícula viral de PRRSV incluem CD169 e CD163 (importante na libertação do genoma) (Eric J. Snijder 1. M., 2013), sialoadesina (molécula de superfície própria de macrófagos, que se encontra sobretudo nos macrófagos do baço, fígado, nódulos linfáticos, medula óssea, pulmões e cólon), sulfato de heparina glicosaminoglicanos.

1.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

O vírus de PRRS encontra-se presente na maioria das regiões do Mundo e ao longo dos últimos anos tem vindo a ser estudado por forma a perceber-se a forma como se transmite nos efetivos de suínos. O facto de os animais serem vacinados faz com que a diferenciação entre os anticorpos do vírus de campo e do vírus vacinal não seja facilmente conseguida (Dea S B. R., 1992a).

Observou-se que a probabilidade de infeção depende da forma como os animais são expostos ao vírus (Zimmerman, 2003). A exposição pode ocorrer por via intranasal, intramuscular e provavelmente também por via intra-peritoneal (Wagstrom EA1, 2001) (Yoon K. J., 1995), e a transmissão da infeção ocorre através do derrame do vírus pela saliva, pelas secreções nasais, urina, sêmen e fezes, o que também resulta em contaminação ambiental, logo uma forma eficaz de eliminar o vírus é através de procedimentos eficazes de limpeza e desinfeção (Zimmerman, 2003). Esta

contaminação cria uma potencial via de transmissão pois, embora no meio ambiente o vírus possua uma duração muito curta por ser rapidamente inativado através do processo de secagem, pode permanecer infeccioso por um período de tempo mais prolongado em determinadas condições de temperatura, pH e humidade (Dee S, Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome, 2002b) (Dee S, Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome33, 2002 a).

A persistência do vírus nas explorações deve-se a diferentes mecanismos, e embora na fase aguda nem todos os animais se infetem, todos são suscetíveis de se infetarem a qualquer momento de vida, e de se manter assim o vírus na exploração (Perestrelo Vieira, 1998). Para além disso, determinados animais podem ser portadores crónicos da doença e re-excretar o vírus vários meses após a infeção.

A patogenicidade do PRRSV encontra-se relacionada com a estirpe do vírus, que podem ser classificados em dois grupos, o dos vírus de alta patogenicidade e o dos vírus de baixa patogenicidade (Halbur P.G., 1996). A base para as diferenças de virulência ainda não é conhecida, mas há estudos que demonstram que o vírus parece interagir com outros vírus e também com bactérias, nomeadamente com o *Mycoplasma hyopneumoniae* (Perestrelo Vieira, 1998).

Nas estirpes de baixa virulência os sinais que ocorrem ao nível dos animais são a diminuição do crescimento, um aumento da mortalidade, expressão clínica de outras doenças, e baixo rendimento reprodutivo.

Nas estirpes de virulência alta, observam-se animais com inapetência, febre e dispneia, partos prematuros e em menor percentagem partos tardios (gestação superior a 115 dias), nados mortos, múmias, fetos mortos e fetos nascidos débeis, com uma mortalidade pré desmame elevada (superior a 15 %).

1.4 SINAIS CLÍNICOS

No caso dos animais adultos os sinais clínicos mais frequentes que se podem observar são períodos de anorexia, febre moderada, letargia (Keffaber K, 1992) (Luque, 2006) podendo ocasionalmente observar-se a presença de edemas subcutâneos, cianose nas orelhas, extremidades e vulva (Hopper SA, 1992) (Rossow, 1998).

Nas porcas gestantes é essencialmente a anorexia e a febre os primeiros sintomas a serem observados, podendo numa fase mais avançada surgir as falhas ao nível reprodutivo (Luque, 2006) (Keffaber K, 1992) (Lager KM M. W., 1996).

Nos varrascos, a infeção pode provocar uma diminuição da libido durante o período de cerca de uma semana (Hopper SA, 1992) (Feitsma H, 1992) (Prieto C G. C., 2003).

No caso dos leitões, a idade dos animais é o maior fator de influência para a observação dos sinais clínicos (Rossow KD C. J.-H., 1995), sendo que quando os leitões nascem vivos e infetados costumam apresentar apatia, anorexia, dispneia e cianose (Rossow KD s. J., 1999).

1.5 DIAGNÓSTICO

O vírus de PRRSV pode ser diagnosticado provisoriamente através dos sinais clínicos que afetam os animais. As lesões microscópicas características dos pulmões, e em vários outros tecidos, podem ser sugestivas, mas por outro lado também podem ser lesões causadas por outros agentes infecciosos (K-J Yoon, 2003).

Para confirmar as lesões específicas de PRRSV é necessário recorrer a outros tipos de testes de diagnóstico. Assim sendo, quando a história clínica e patológica dos animais é sugestiva de PRRS, e existem evidências que os animais podem ser portadores da doença, devem-se usar testes que identifiquem a doença pela deteção de Antígenos virais, ou pela deteção do ácido nucleico do vírus (RNA).

Nos animais possivelmente afetados, tem sempre que se ter em consideração que o vírus pode ser detetado quer em animais vacinados para a doença de PRRS, quer em animais realmente infetados. Deste modo, o tempo após a vacinação, ou a história dos animais devem ser tomados em consideração sempre que se realiza um diagnóstico de presença de vírus de PRRS.

Para realizar uma correta deteção e isolamento do vírus de PRRS, as amostras devem sempre ser colhidas o mais brevemente possível durante a ocorrência da doença. As amostras colhidas durante a fase viral da doença normalmente possuem quantidades significativas de vírus mas quando são colhidas tardiamente podem induzir a resultados negativos (K-J Yoon, 2003). Quantidades inadequadas de amostra podem levar a resultados inconclusivos ou a falsos negativos.

Para que a deteção do vírus ocorra eficazmente, as amostras colhidas devem ser mantidas frescas e transportadas de imediato após a recolha para o laboratório, a

temperaturas não superiores a 4 °C, e sempre que forem realizados longos períodos de armazenamento devem ser mantidas a temperaturas inferiores a -20 °C (K-J Yoon, 2003).

A demonstração da seroconversão ou aumento dos títulos de anticorpos no grupo de animais afetados também se pode utilizar para o diagnóstico da infecção, contudo é necessário ter sempre em atenção se os animais se encontram vacinados, por forma a avaliar se os anticorpos detetados pelos métodos serológicos são anticorpos de vacinação ou anticorpos devidos a infecção. Os testes serológicos disponíveis não realizam esta diferenciação. Para obtenção de resultados mais específicos, a monitorização deve ser sempre realizada através da utilização de outros tipos de testes, nomeadamente por PCR (Polymerase Chain Reaction), RT – PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction), Isolamento de vírus (VI), que combinados com serologia podem demonstrar com clareza a presença ou ausência de vírus.

1.5.1 ISOLAMENTO DO VÍRUS

O vírus PRRS é conhecido por apenas replicar em 2 tipos de células em cultura, os macrófagos alveolares de suínos (PAMs – *pig alveolar macrophages*) e algumas células renais de macacos Africanos (Dea S B. R., 1992a) (Luque, 2006). No entanto este vírus foi isolado em diversos tipos de tecidos animais (K-J Yoon, 2003), incluindo soro, plasma, células mononucleares periféricas do sangue, medula óssea, amígdalas, pulmão, baço, coração, cérebro, epiderme, ductos deferentes, gânglios bolbo-uretrais, tecido peniano, faringe, mucosa bucal, placenta, saliva, urina, fezes e sêmen (Baron T, 1992). O fluido colhido nos pulmões – fluido alveolar, e o soro são considerados os tipos de amostras preferidas para isolamento do vírus quando ocorre um surto da doença (Rossow, 1998).

1.5.2 DETEÇÃO DO VÍRUS

Atualmente as técnicas que se utilizam com maior frequência para a deteção de antígenos de PRRSV são o teste de anticorpos fluorescentes (FAT) e o teste imuno-histoquímico (IHQ) (Van Alstine WG, 2002) (Luque, 2006) (Benfield DA, 1992). Qualquer um dos testes referidos pode ser utilizado para realizar a deteção do antígeno do vírus PRRS em tecidos.

O teste de FAT realiza-se normalmente em materiais frescos ou tecidos congelados, sendo um teste caro, rápido e específico, contudo não muito sensível (tende a apresentar alguns resultados falsos positivos), e a qualidade da amostra influencia diretamente os resultados (Joo HS, 1990).

Em oposição ao teste FAT, o teste imuno-histoquímico (IHQ) é utilizado para realizar a detecção do vírus em tecidos conservados em formol, sendo mais sensível do que os testes FAT que utilizam as amostras de tecidos congelados. Para a realização de um diagnóstico definitivo, qualquer que seja a prova utilizada, esta deve ser acompanhada pela detecção microscópica de lesões características de PRRS, conjuntamente com os testes IHQ e FAT.

1.5.3 DETECÇÃO DO ÁCIDO NÚCLEÍCO DO VÍRUS

Para a detecção do ácido nucleico viral utiliza-se a técnica de hibridação *in situ* (em cortes de tecidos) (Haynes JS, 1997) (Sur JH, 1996) e mais recentemente RT-PCR (Luque, 2006) (Christopher-Hennings J, 1995).

Os testes de RT-PCR por vezes são pouco específicos, apesar de altamente sensíveis, não realizam a diferenciação entre estirpes vacinais e de campo, sendo que uma forma de solucionar esta questão é através de sequenciação do produto da amplificação (Christopher-Hennings J, 1995) (Luque, 2006) (K-J Yoon, 2003).

A detecção do ácido nucleico viral não se relaciona diretamente com a presença de vírus infeccioso, mas verifica-se que a correlação entre o resultado positivo do RT-PCR e o isolamento do vírus é superior a 80 % (Christopher-Hennings J, 1995) (Horter DC & Chang CC, 2002). Por outro lado, a técnica de RT-PCR pode perder sensibilidade quando se utilizam *pools* de amostras (Luque, 2006), e quanto maior o número de amostras existentes no *pool* menor a sensibilidade (Luque, 2006).

Além disso, em conformidade com os *primers* utilizados e os fragmentos a serem amplificados, a variabilidade genética do PRRSV pode ser um inconveniente, e de forma a solucionar este tipo de problema foram desenvolvidos diferentes tipos de PCR para detetar diferentes regiões do genoma viral (ORF 7, ORF 6 e ORF 1b), podendo também detetar diretamente espécies de diagnóstico (Luque, 2006).

Quando o objetivo da detecção do ácido nucleico é analisar as mudanças ocorridas entre as estirpes ou na mesma estirpe, a ORF 5 é um bom alvo para a realização da amplificação e sequenciação, todavia é sempre aconselhável amplificar também a ORF

6 como controlo, pois tem uma sequência muito conservada (Luque, 2006). A sequenciação é assim útil para monitorizar o movimento, a origem e a evolução das estirpes de uma exploração (Luque, 2006).

1.5.4 DETEÇÃO DE ANTICORPOS NO SORO

Na Europa as técnicas mais utilizadas para a deteção de anticorpos específicos para o vírus de PRRS no soro de suíno são: o teste de imunofluorescência indireta (IFA), o teste de neutralização do vírus no soro (VNT), o ensaio de imunoperoxidase (IPMA), e o ensaio imuno enzimático da enzima ligada (ELISA) (Christopher-Hennings J, 1995) (Luque, 2006).

O teste ELISA, juntamente com o RT-PCR é utilizado para realizar a deteção do vírus de campo, e de acordo com o tipo de teste ELISA utilizado, pode efetuar-se a diferenciação entre infeções pelo genótipo Europeu e genótipo Americano. Os diferentes testes de ELISA comerciais disponíveis no mercado encontram-se direcionados para a proteína N.

Quando se realiza o teste ELISA e se obtém um resultado positivo, tem sempre que se ter em atenção que pode não se relacionar diretamente com uma infeção recente, pois os anticorpos podem ser detetados durante um largo período de tempo, normalmente a partir dos 7 a 14 dias pós infeção, e desaparecem geralmente antes dos doze meses, sendo que já foi possível efetuar deteção até os 600 dias (Luque, 2006). Além disso, os anticorpos maternos duram em média até às quatro a cinco semanas de idade, pelo que é habitual detetar o PRRS em leitões de maternidade ou no início da fase de transição (Wills RW, 2003).

O teste ELISA tem muitas vantagens, para além de ser automático, realiza uma quantificação aproximada de anticorpos, e tem a capacidade de identificar as estirpes europeias e americanas do vírus.

A técnica de imunofluorescência indireta IFA possui alta especificidade (99,5 %), permite a deteção diferenciada de imunoglobulinas M e G, sendo que as primeiras são detetáveis a partir dos 5 dias pós infeção até aos 28 dias, e as segundas são detetáveis desde os 10 até aos 120 dias pós infeção (Joo HS, 1990) (Luque, 2006). A sensibilidade desta técnica encontra-se diretamente associada à diferença antigénica entre a estirpe utilizada no teste IFA e a estirpe que induz os anticorpos a detetar na amostra em análise (Christopher-Hennings J, 1995).

1.5.5 NEUTRALIZAÇÃO VÍRICA

A técnica de detecção de anticorpos neutralizantes é considerada uma prova de elevada especificidade, porém a sua aplicação na valorização da resposta imune do diagnóstico tem como principal problema detetar anticorpos que não aparecem até várias semanas depois do início da infeção / vacinação. Por outro lado, os resultados da técnica utilizada podem variar de acordo com o grau de homologia entre o vírus utilizado e estirpe em análise (Luque, 2006) (Yoon K. J., 1995).

1.6 CONTROLO

A nível Mundial não existe uma estratégia que realize eficazmente o controlo do vírus PRRS, principalmente devido à variabilidade genética do vírus, às dimensões das explorações e às diferentes formas de transmissão.

Para um controlo mais eficaz é essencial a precisão de um diagnóstico de forma a confirmar a doença e epidemiologia existente numa exploração (Dee S, Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome³³, 2002 a). Isso requer a caracterização da doença através da demonstração de lesões, e de um perfil serológico dos animais presentes na exploração nas diferentes fases de produção.

Na realização dos testes serológicos deve-se considerar uma amostra significativa de animais, pois não se devem analisar animais individualmente. Os testes devem ser realizados em cada etapa de produção de forma a identificar a fase da infeção dos animais presentes na exploração, assim como a forma como o vírus circula na exploração. Após a identificação da doença, deve ser preparada uma estratégia para eliminar e controlar o PRRSV presente na exploração. Para conseguir controlar o vírus é necessário diminuir a probabilidade de transmissão do vírus de mães para os fetos e crias.

Este controlo pode ser realizado através de vacinas, através de um plano profilático adequado, substituição de reprodutores, infeção de toda a exploração de forma propositada, ou a combinação dos vários planos.

Não havendo um tratamento específico para o vírus de PRRS, os antibióticos de largo espectro podem ser úteis no controlo de infeções secundárias e os anti-inflamatórios são usualmente administradas durante a doença na fase aguda. Outras técnicas também utilizadas pelas explorações como tentativa de erradicação de PRRSV incluem o desmame precoce e isolamento de leitões, diferentes protocolos de vacinação para

PRRS, monitorização sorológica regular dos animais da exploração através da realização de testes de diagnóstico como ELISA, RT-PCR e IFA, e através da eliminação de portadores persistentes nas explorações e melhoramento da biossegurança.

Parte II – Trabalho Experimental

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Para a realização do estudo foram colhidas 200 amostras de soro de suíno em Portugal Continental, nas diferentes regiões NUTS (Nomenclatura das Unidades Territoriais para fins estatísticos).

O cálculo do número de amostras foi executado de acordo com a distribuição do efetivo nas diferentes regiões NUTS tendo por base a estatística de 2010 do Instituto Nacional Estatística.

As amostras de soro colhidas foram provenientes de suínos de descendência (engorda) com idades compreendidas entre as 4 e as 24 semanas, e soros de suínos reprodutores fêmeas.

As amostras foram colhidas durante o período de Fevereiro a Março de 2014, tendo sido analisadas por dois métodos diferentes, ELISA e RT-PCR.

As amostras foram analisadas individualmente pelo método ELISA com três *kits* comerciais diferentes – HerdCheck PRRS X3 (Laboratórios IDEXX) que realiza a deteção de ambas as estirpes (Europeia e Americana), Civtest Suis E/S (Laboratórios Hipra) para deteção da estirpe Europeia do vírus PRRS e Civtest suis A/S (Laboratórios Hipra) para deteção da estirpe Americana.

Posteriormente, foram realizados *pools* de amostras de 5 soros, às quais foi efetuada a extração de RNA com o *kit* comercial QIAamp Viral RNA Mini *Kit* (Qiagen), seguida de amplificação pelo *kit* comercial INgene q PRU SYBR Green Detection (Ingenasa).

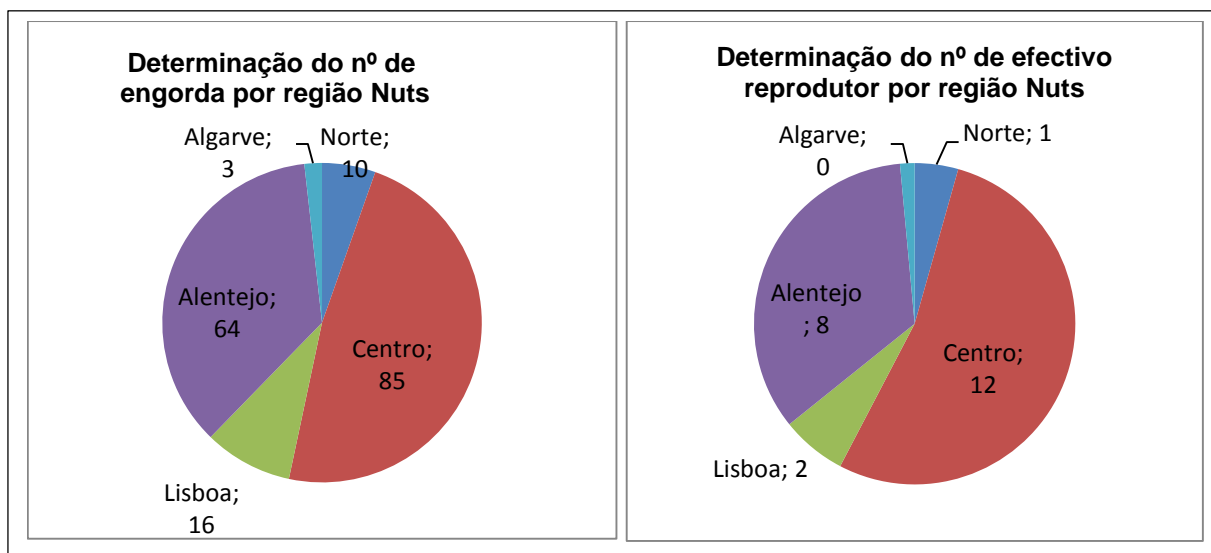


Figura 3 – Determinação do número de amostras para análise por região NUTS em Portugal Continental (Cálculo do Win Episcope 2.0 do tamanho da amostra)

2.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Após a colheita de amostras em tubos Kabe com grânulos com capacidade de 5 mL, por parte dos responsáveis pelas explorações, estas foram devidamente acondicionadas a uma temperatura de 4 °C e enviadas de imediato para o laboratório.

No laboratório, após receção as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 8500 g durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Após a separação do coágulo do plasma, cada amostra foi dividida em dois microtubos, um foi congelado a -20 °C para posteriormente ser processado para análise por RT-PCR, e o outro foi devidamente refrigerado 5 °C (+/- 3 °C) e posteriormente analisado por ELISA utilizando os *kits* comerciais em teste – Herdcheck IDEXX , Civtest E/S e Civtest A/S.

2.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS PELA TÉCNICA ELISA

A análise das amostras pela técnica ELISA foi seguida de acordo com os diferentes protocolos de cada *kit* comercial (Anexo II).

O ensaio realizado com o *kit* IDEXX PRRS X3 consistiu num ensaio imuno enzimático e consistiu numa microtitulação em placas impregnadas com antígenos do vírus PRRS.

Inicialmente as amostras são incubadas após diluição na cavidade impregnada, e quando existem anticorpos específicos contra o vírus de PRRS estes formam complexos com o antígeno da placa, de seguida as cavidades são lavadas por forma a retirar o material não aderido, e é adicionado um conjugado de anticorpo anti suíno se liga ao anticorpo suíno aderido às cavidades.

Em seguida, o conjugado que não se ligou ao antígeno é lavado e o substrato de tetrametilbenzidina (TMB) é adicionado às cavidades. O surgimento subsequente de cor é de acordo com a quantidade de anticorpos anti – PRRS ligados ao antígeno.

Os ensaios realizados com os *kits* Civtest E/S (estirpe Europeia) e A/S (estirpe Americana), são ensaios imuno enzimáticos indiretos.

Nestes ensaios os antígenos específicos do vírus PRRS foram distribuídos nos 96 poços da microplaca, e o ensaio consiste numa diluição dos soros de suíno e colocação na microplaca que de seguida se incuba a uma temperatura de 37 °C por um período de 60 minutos. No decorrer desta incubação, os anticorpos específicos de PRRS unem-se ao antígeno impregnado nos poços ficando retidos nesses poços durante o processo de lavagem. Seguidamente, adiciona-se uma solução de conjugado que se vai unir aos anticorpos anti suíno retidos nos poços. Posteriormente volta a lavar-se a placa de forma a retirar o excesso de conjugado que não ficou retido e adiciona-se por sua vez um substrato cromogénico específico de peroxidase. Por conseguinte o aparecimento de cor em cada poço é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos específicos de PRRS presentes na amostra.

2.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR RT-PCR

A análise das amostras pela técnica RT-PCR consistiu na realização de diferentes *pools*, com um conjunto de 5 amostras de soros por cada *pool* (40 µl de soro por *pool* de 200 µl).

Todavia, o *kit* utilizado de RT-PCR não possibilita a diferenciação entre a estirpe Americana e a Estirpe Europeia.

2.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA viral PRRS foi realizada com o *kit QIAmp viral RNA* da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO RNA VIRAL POR RT-PCR

A amplificação do RNA viral foi realizada utilizando o *kit* comercial INgene q PRU SYBR Green Detection da Ingenasa (Anexo III). Na técnica de amplificação do vírus por RT-PCR foi utilizado um termociclador BIORAD modelo CFX96.

A mistura de reação utilizada foi processada de acordo com as instruções do fabricante Ingenasa e de acordo com o protocolo do *kit* INgene q PRU SYBR Green Detection que inclui os primers específicos (Anexo IV). Assim, e de acordo com o protocolo foi preparado por cada 2 µl de amostra, 20,5 µl de Master Mix (10 µl de Tampão de Amplificação, 10 µl de Mistura A e 0,5 µl de mistura B).

O processo de amplificação consistiu num período de 30 minutos a 50 °C (síntese) e 10 minutos a 95 °C (desnaturação). A amplificação ocorreu através de 40 ciclos (15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C com leitura de fluorescência após cada 60 segundos), e terminando num período de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e por fim 15 segundos a 95 °C.

3. RESULTADOS

As amostras foram analisadas pela técnica ELISA, com o *kit* Civtest A/S para deteção da estirpe Americana de PRRSV, e com o *kit* Civtest E/S para a deteção da estirpe Europeia.

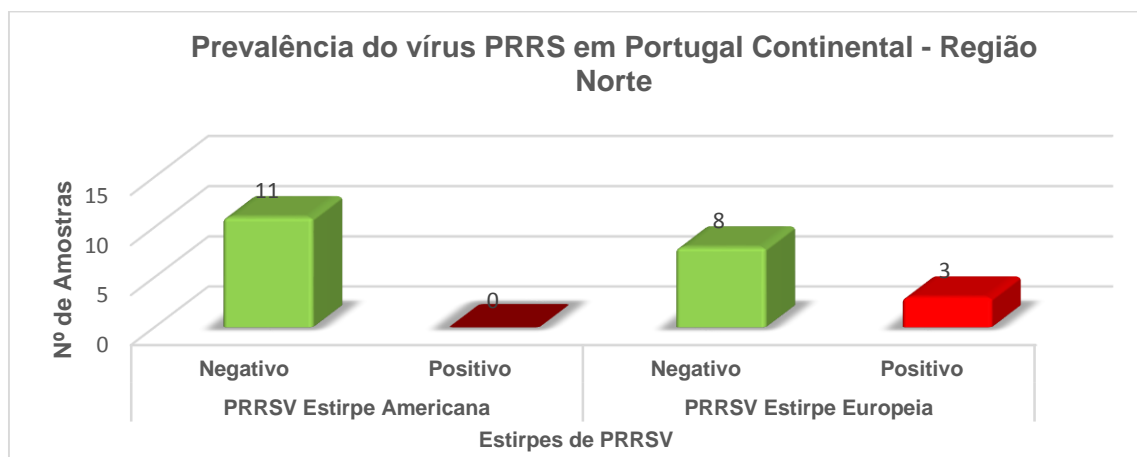


Gráfico 2.1 – Prevalência do vírus de PRRS em Portugal Continental, região Norte (regiões Nuts Fonte INE2010).

Os resultados apresentados referem-se aos resultados obtidos para as duas estirpes do vírus de PRRS presentes nas amostras rececionadas provenientes das diferentes regiões Nuts.

As amostras referentes à região norte de Portugal Continental, quando analisadas para o vírus PRRS estirpe Americana apresentaram 100 % dos resultados negativos, como é visível pelo gráfico 2.1.

No entanto, para a deteção da estirpe Europeia verificou-se que apenas 72,73 % das amostras analisadas apresentaram resultados negativos para PRRS, sendo que uma das amostras que apresentou resultados positivos correspondia a soro de reprodutora que tinha sido vacinada.

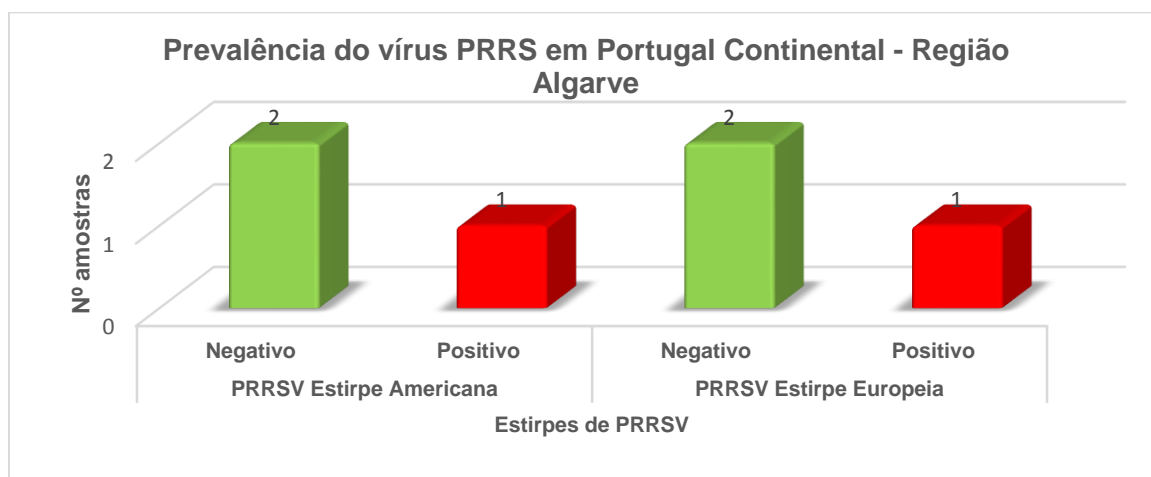


Gráfico 2.2 – Prevalência do vírus de PRRS em Portugal Continental, região Algarve (regiões Nuts Fonte INE2010).

No Algarve foram apenas analisadas três amostras e obtiveram-se 66,64 % de resultados negativos para a presença do vírus de PRRS, como se pode ver pelo gráfico 2.2. Ambas as estirpes se encontram presentes na região em 33,64 % das amostras analisadas.

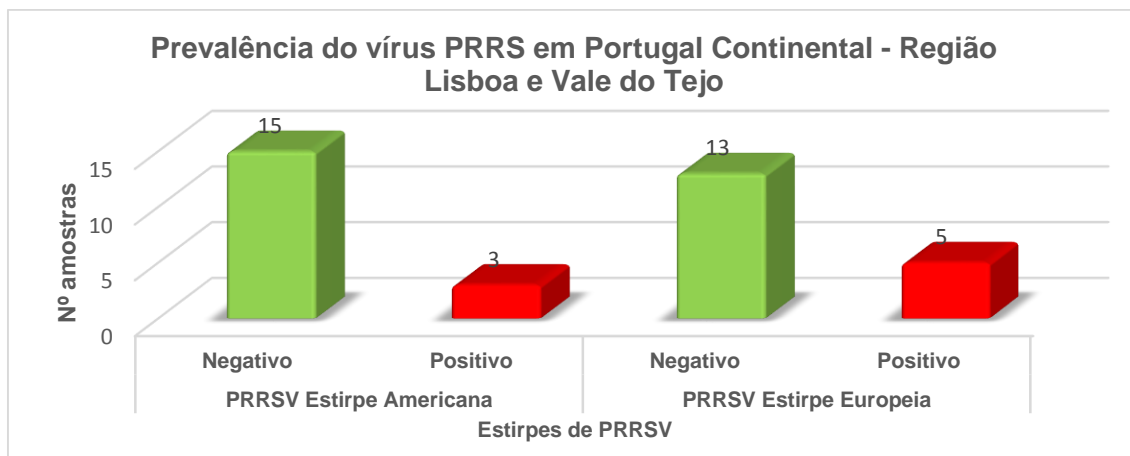


Gráfico 2.3 – Prevalência do vírus de PRRS em Portugal Continental, região Lisboa e Vale do Tejo (regiões Nuts Fonte INE2010).

O gráfico 2.3 mostra que a região de Lisboa e Vale do Tejo, para as amostras analisadas, apresentou positividade para ambas as estirpes, sendo que a estirpe Americana se encontra em menor número de animais do que a estirpe Europeia, contudo observou-se que a estirpe Americana se encontra presente em 18 % dos animais analisados, enquanto a estirpe Europeia se encontra presente em 27.78 %.

Apesar de ambas as estirpes do vírus PRRS se encontrarem presentes nas amostras provenientes de soros dos suínos analisados, observou-se pelas análises que o vírus de PRRS não apresenta grande predominância na região de Lisboa e Vale do Tejo, isto porque na sua grande maioria as amostras apresentaram resultados negativos e 72,22 % apresentam resultados negativos para a estirpe Europeia.

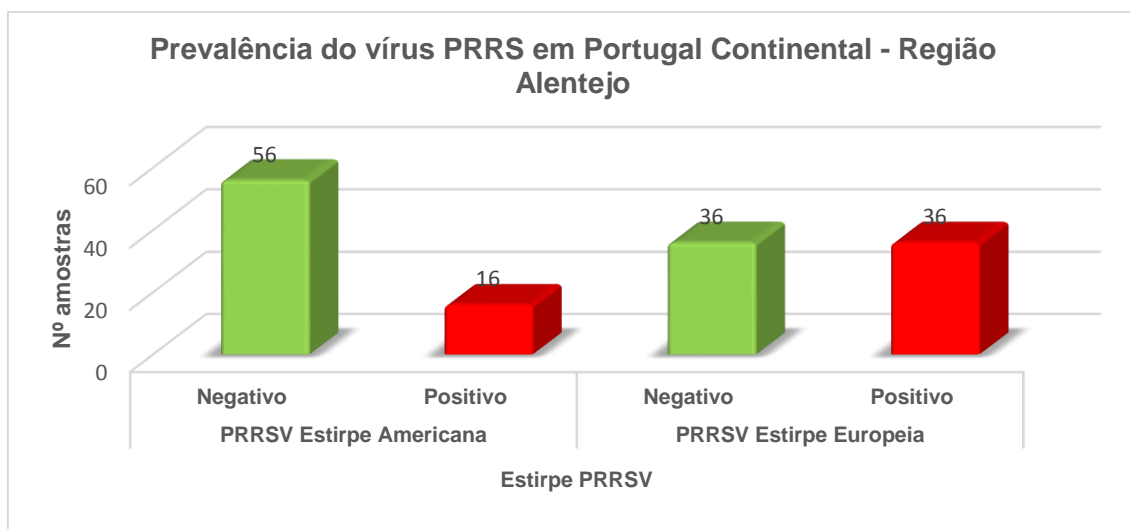


Gráfico 2.4 – Prevalência do vírus de PRRS em Portugal Continental, região Alentejo (regiões Nuts Fonte INE2010).

Através do gráfico 2.4 observamos que as amostras analisadas na região do Alentejo apresentaram para a estirpe Europeia de PRRSV uma prevalência de 50 %, e para a estirpe Americana presente em que 22,22 % das amostras.

No gráfico 2.5, verificamos que na região Centro de Portugal Continental encontram-se presentes ambas as estirpes do vírus de PRRS.

A estirpe Americana surge em menor percentagem (23,96 %) e a estirpe Europeia surge com grande incidência apresentando 51 % de resultados positivos.

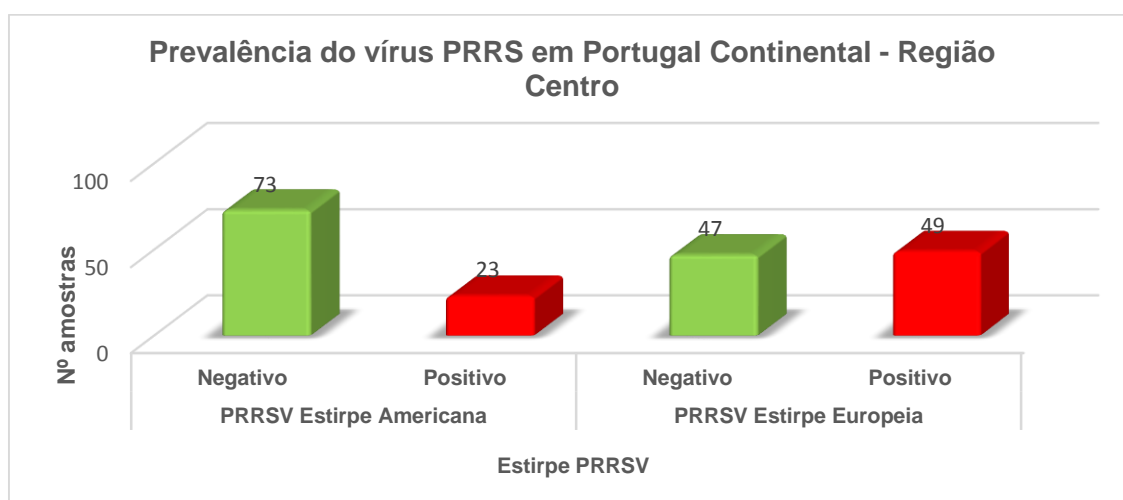


Gráfico 2.5 – Prevalência do vírus de PRRS em Portugal Continental, região Centro (regiões Nuts Fonte INE2010).

Assim, e de acordo com o gráfico 2.6 sobre a prevalência da estirpe Americana de PRRSV em Portugal Continental verifica-se que esta se encontra presente em quase todo o território com exceção do Norte, em que não foram detetados casos.

No entanto, constatou-se que 78,5 % das amostras analisadas apresentaram resultados negativos para a presença de anticorpos para a estirpe Americana de PRRSV e apenas 21,5 % das amostras analisadas apresentaram resultados positivos.

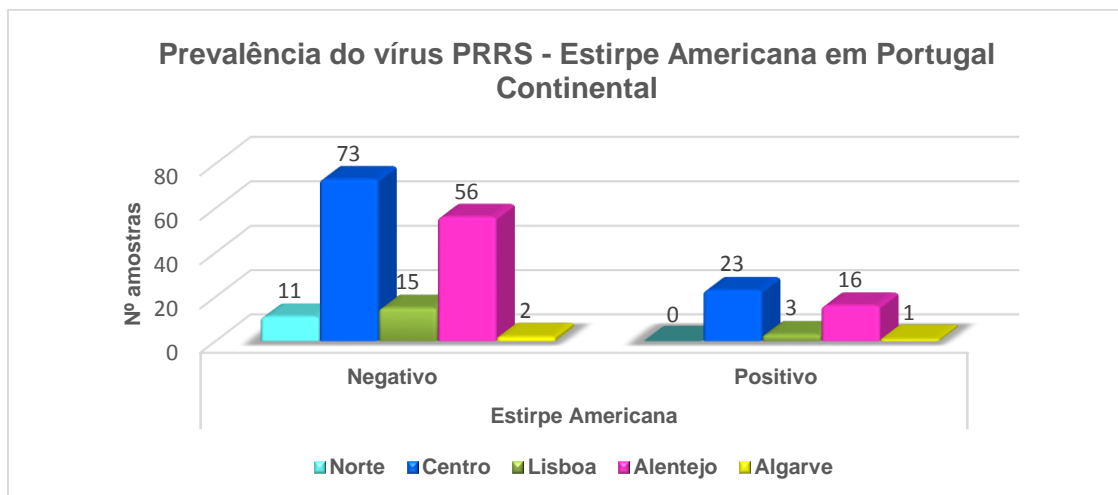


Gráfico 2.6 – Prevalência do vírus PRRS Estirpe Americana em Portugal Continental por regiões Nuts (regiões Nuts Fonte INE2010).

Contudo a prevalência da estirpe Europeia sobrepõe-se à estirpe Americana, visto a estirpe Europeia representar 47 % de resultados positivos em oposição aos 21,5 % positivos detetados para a estirpe Americana.

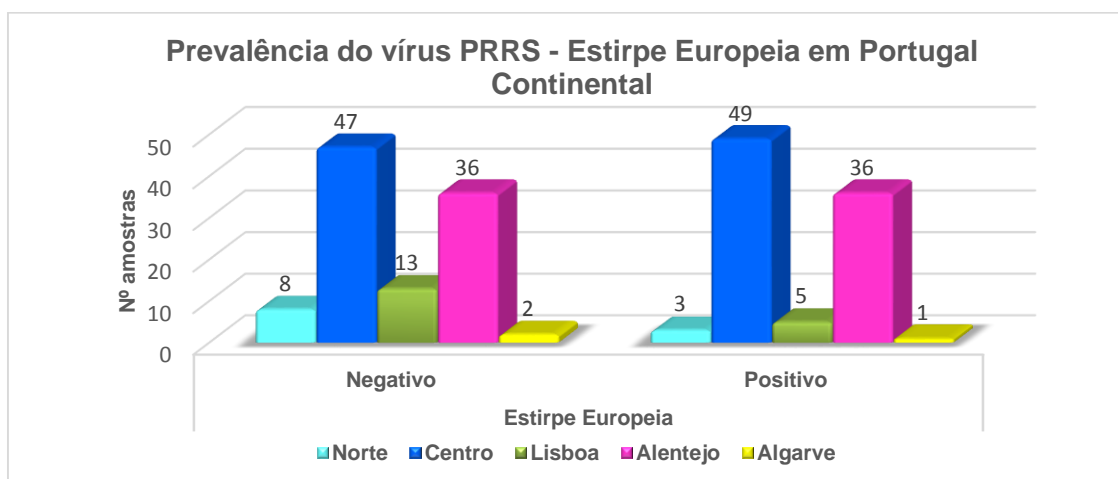


Gráfico 2.7 – Prevalência do vírus PRRS Estirpe Europeia em Portugal Continental por regiões Nuts (regiões Nuts Fonte INE2010).

Nas amostras analisadas a estirpe Europeia apresentou 53 % de resultados negativos face a 47 % de resultados positivos. Observou-se que as zonas mais afetadas em Portugal Continental são as regiões Centro e o Alentejo com 90 % dos casos de PRRSV, enquanto as menos afetadas são as regiões do Algarve e de Lisboa e Vale do Tejo.

Por forma a realizar a comparação dos resultados obtidos pelo método ELISA foi avaliado o grau de sensibilidade e especificidade dos *kits* utilizados.

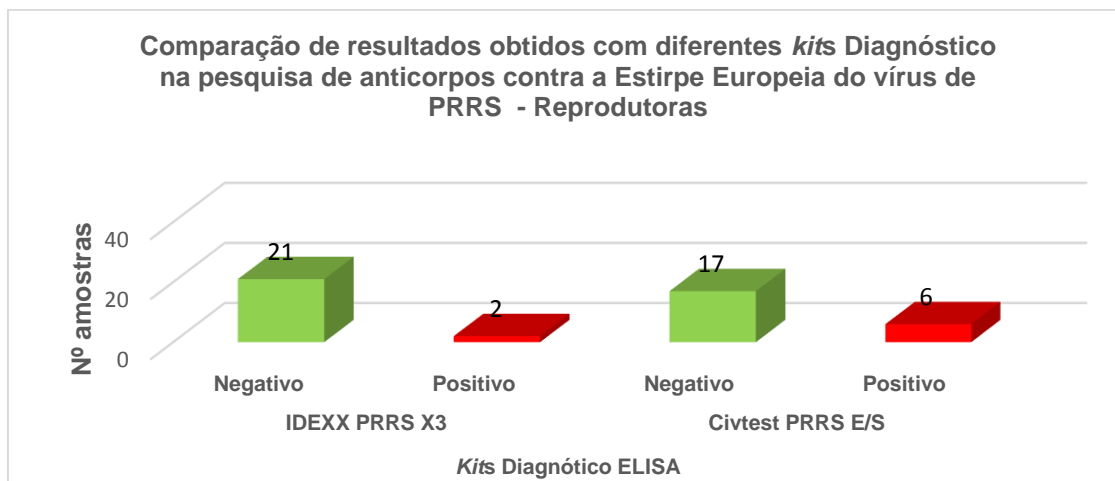


Gráfico 2.8 – Estudo comparativo dos resultados obtidos com diferentes *kits* de diagnóstico na pesquisa de anticorpos contra a Estirpe Europeia de PRRSV em soros de reprodutoras colhidos nos meses de Fevereiro e Março de 2014 em diferentes regiões Nuts Portugal Continental (INE2010).

O *kit* IDEXX PRRS X3 apresentou 8,7 % de resultados positivos para o PRRSV em amostras de fêmeas, face a 26,1 % de resultados positivos apresentados pelo *kit* Civtest E/S.

De modo a verificar a evolução da presença de PRRSV ao longo do período de engorda, as diferentes amostras analisadas foram agrupadas por idades, tendo sido considerados três períodos diferentes. O primeiro período refere-se a animais com idades compreendidas entre as 4 e as 6 semanas (gráfico 2.9), o segundo período a animais com idades entre 8 e as 16 semanas (gráfico 2.10), e o terceiro período entre 18 e as 24 semanas (gráfico 2.11).

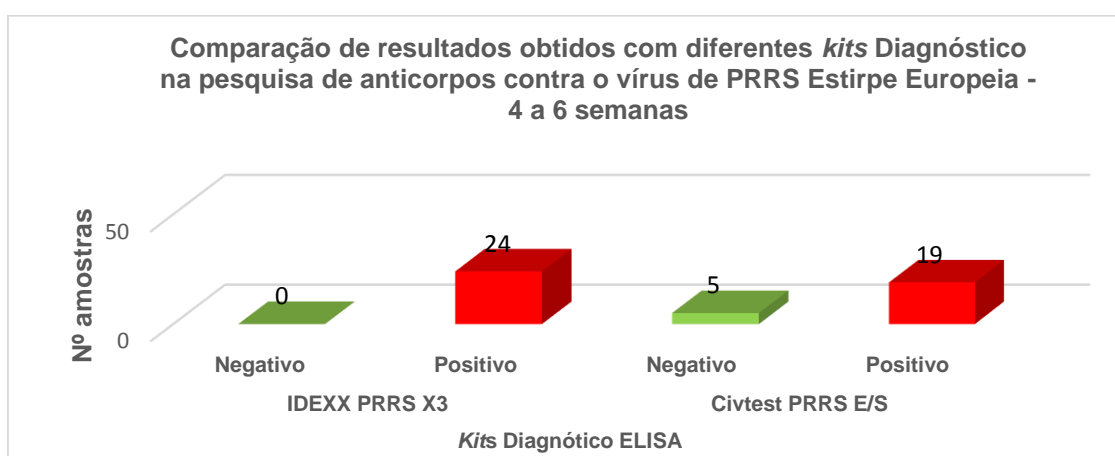


Gráfico 2.9 – Estudo comparativo de resultados obtidos com diferentes *kits* de diagnóstico na pesquisa de anticorpos contra o PRRSV Estirpe Europeia em soros de suínos de engorda (4 a 6 semanas) (regiões Nuts Fonte INE 2010).

Após realização da análise com os diferentes *kits* comerciais avaliados verificou-se que as amostras analisadas com o *kit* IDEXX PRRS X3 apresentaram 100 % de resultados positivos às 4, 5 e 6 semanas. Todavia, as mesmas amostras analisadas com o *Kit* Civtest E/S apresentaram 26,32 % de resultados Negativos, e apenas 73,68 % de resultados positivos.

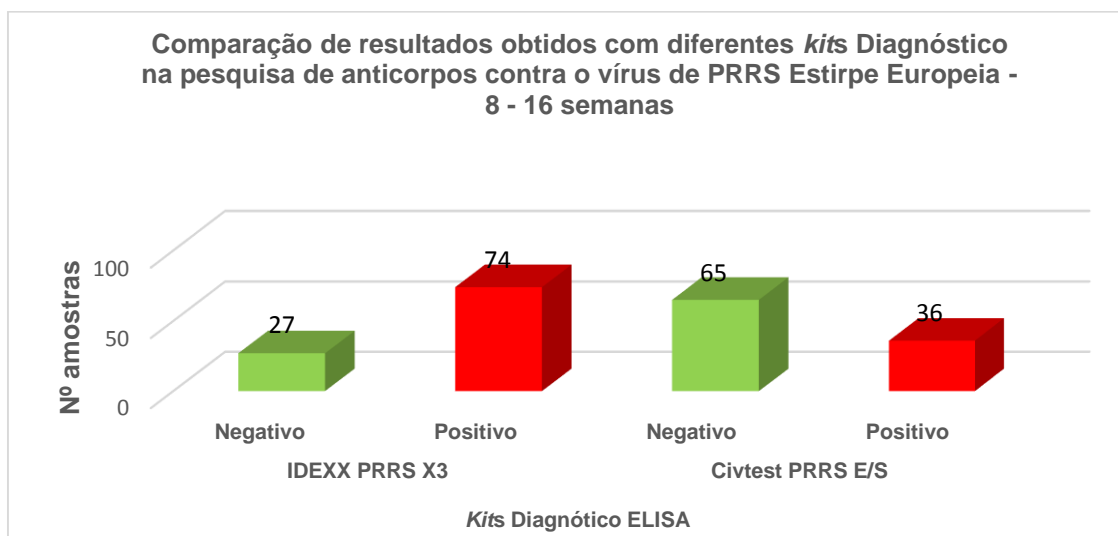


Gráfico 2.10 – Estudo comparativo de resultados obtidos com diferentes *kits* de diagnóstico na pesquisa de anticorpos contra o PRRSV Estirpe Europeia em soros de suínos de engorda (8 a 16 semanas) (regiões Nuts Fonte INE 2010).

O *kit* IDEXX PRRS X3 apresentou 73,27 % de resultados positivos em amostras provenientes de animais com idades compreendidas entre as 8 e as 16 semanas enquanto com o *kit* Civtest E/S apresentou 35,64 % de resultados positivos.

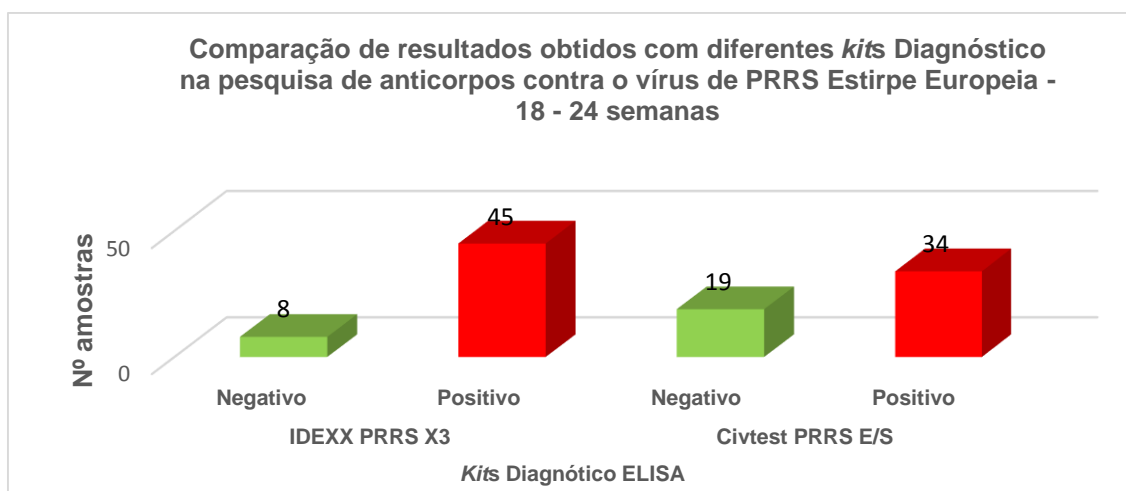


Gráfico 2.11 – Estudo comparativo de resultados obtidos com diferentes *kits* de diagnóstico na pesquisa de anticorpos contra o PRRSV Estirpe Europeia em soros de suínos de engorda (18 a 24 semanas) (regiões Nuts Fonte INE 2010).

Nos animais com idade compreendida entre as 18 e as 24 semanas o *kit* IDEXX PRRS X3 apresentou 84,9 % e o *kit* Civtest E/S apresentou 64,15 % de resultados positivos.

Na análise realizada pelo método RT-PCR, verificamos que as amostras provenientes de animais entre as 4 e as 18 semanas apresentam resultados positivos para a presença de RNA de PRRSV, e as amostras de animais com mais de 20 semanas apresentam resultados negativos. No caso das reprodutoras estas apresentaram resultados negativos para a presença de RNA de PRRSV.

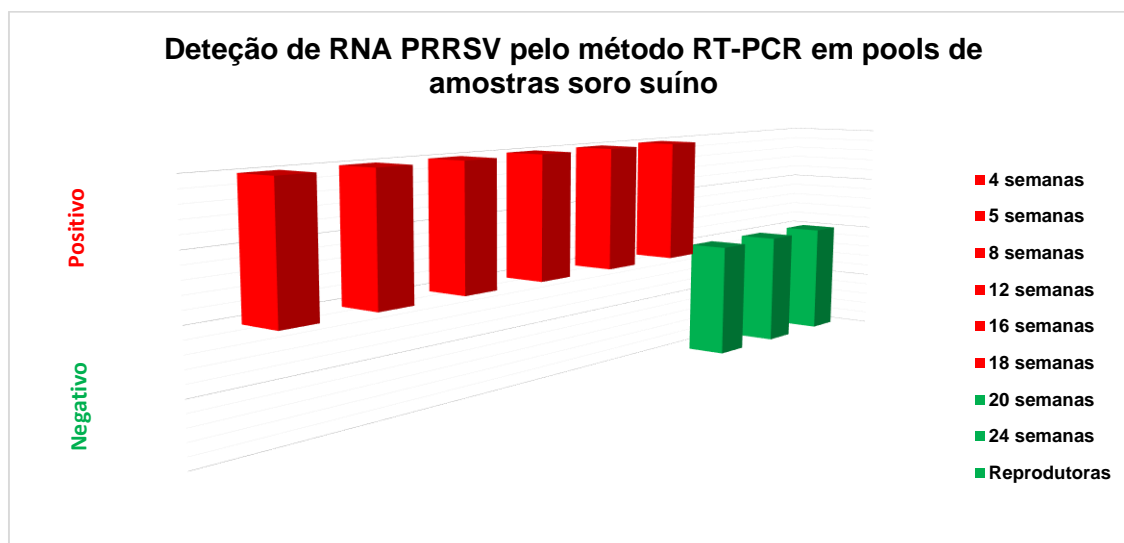


Gráfico 2.12 – Deteção de RNA PRRS pelo método RT-PCR em *pools* de amostras de soro de suíno colhidos no mês de Fevereiro e Março de 2014 em diferentes regiões Portugal Continental (regiões Nuts Fonte INE 2010).

4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Após estudarmos a prevalência do vírus de PRRS na zona Norte de Portugal Continental, observou-se não existir a estirpe Americana. No entanto, verificou-se a presença da estirpe Europeia com baixa prevalência. Esta baixa prevalência de PRRSV poderá dever-se a fatores como a pequena densidade populacional, o pequeno número de explorações, e as explorações possuírem pequeno número de efetivos, assegurando uma maior eficácia no controlo de explorações infetadas, e propagação da doença.

A menor movimentação de animais entre explorações é também uma possível causa de baixa prevalência do vírus de acordo com o referido por Zimmerman et al. (2003) (Zimmerman, 2003).

Outro fator que poderá ter influência nos resultados obtidos é a altura do ano em que as amostras foram colhidas. As amostras analisadas provenientes da zona Norte foram colhidas nos meses de Fevereiro e Março, que é uma altura em que as temperaturas são relativamente baixas o que influencia negativamente a propagação do vírus entre os animais (Dee S, Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome³³, 2002 a).

Na região do Algarve as amostras analisadas mostraram presença de ambas as estirpes, Americana e Europeia, contudo como as amostras analisadas foram apenas três amostras torna-se difícil de avaliar os resultados obtidos, mas salienta-se o facto de uma delas ter apresentado a presença de ambas estirpes do vírus.

Na região centro verificou-se a existência de ambas as estirpes. A estirpe Europeia surgiu em maior número de amostras comparativamente com a estirpe Americana sendo que as amostras positivas para a estirpe Americana também apresentaram resultados positivos para a estirpe Europeia. As amostras que apresentaram maior incidência de casos positivos foram as provenientes de animais com idades compreendidas entre as 16 e as 24 semanas de idade. A região Centro evidenciou elevado número de amostras positivas para PRRSV o que se deverá ao grande número de explorações existentes e a uma densidade populacional dos efetivos bastante grande (Zimmerman, 2003). A circulação entre animais de diferentes explorações também permitirá uma maior frequência da circulação do vírus (Arias, s.d.).

No Alentejo a estirpe Europeia do vírus de PRRS encontrou-se presente em metade das amostras analisadas, sendo que a grande maioria de amostras positivas era proveniente de animais com idades compreendidas entre as 4 e as 8 semanas, pelo que a positividade apresentada poderia ser devida a anticorpos transmitidos pelas mães (Perestrelo Vieira, 1998). A estirpe Americana também apresentou resultados positivos quer em amostras provenientes de leitões quer em amostras provenientes de reprodutoras.

A zona de Lisboa e Vale do Tejo apresentou ambas as estirpes presentes, contudo a estirpe Europeia teve maior presença, esta situação poderá ocorrer devido a troca de animais entre explorações e mesmo à entrada de animais no país oriundos da União Europeia e também ao elevado número de explorações existentes nesta zona (Zimmerman, 2003).

Ao efetuarmos a avaliação dos *kits* de diagnóstico, e quando comparamos os resultados obtidos com os dois *kits* de ELISA comerciais, IDEXX PRRS X3 e Civtest PRRS E/S,

observamos que o *kit* IDEXX PRRS X3 é o que apresenta maior sensibilidade e maior especificidade.

O *kit* IDEXX PRRS X3 apresentou maior sensibilidade que o *kit* Civtest E/S, tendo identificado maior número de resultados positivos para amostras de idades de 4 às 6 semanas, as quais em situações normais possuem anticorpos maternos (Wills RW, 2003).

No caso das amostras provenientes de reprodutoras cujo resultado esperado era a negatividade para o vírus de PRRS, os resultados apresentados pelo *kit* IDEXX X3 foram de apenas dois positivos, enquanto o *kit* Civtest E/S apresentou seis positivos. As mesmas amostras quando submetidas a RT-PCR apresentaram todos os resultados negativos.

Para as amostras entre as 8 e as 16 semanas, o *kit* IDEXX apresentou maior número de resultados positivos quando comparado com o *kit* Civtest estirpe Europeia, e após realização da análise dos pools pelo método RT-PCR observou-se que estes também indicaram a presença de RNA PRRSV nas amostras. Sendo que ao animais descendentes não são vacinados, o RNA detetado deverá ser RNA viral, pois o método RT-PCR e o *kit* utilizado não realizam a diferenciação entre o RNA viral proveniente do vírus e o RNA PRRS vacinal.

Entre as 18 e as 24 semanas, observou-se que o *kit* IDEXX foi novamente mais sensível que o *kit* Civtest apresentando maior número de resultados positivos para a presença de anticorpos contra PRRSV, contudo quando se realizou a pesquisa de RNA de PRRSV pelo método RT-PCR apenas as amostras de 18 semanas apresentaram resultados positivos. Relativamente ao RT-PCR, o número de amostras utilizadas por *pool* poderá ter influenciado diretamente os resultados obtidos, pois quanto maior o número de amostras por *pool*, maior a diluição de cada uma delas, e consequentemente quanto maior a diluição menor a sensibilidade do teste (K-J Yoon, 2003).

Assim pelos resultados obtidos, observou-se que o *kit* IDEXX é mais sensível para a detecção de anticorpos contra o PRRSV, possuindo uma maior precisão nos resultados apresentados, e mais específico para a estirpe Europeia do PRRSV do que o *kit* Civtest E/S. Os resultados obtidos com este *kit* também estiveram mais de acordo com os esperados.

5. CONCLUSÃO

Na sequência da realização deste trabalho concluiu-se que o vírus de PRRS encontra-se presente em todas as regiões Nuts de Portugal Continental.

Na região Norte do país existe apenas a estirpe Europeia.

Nas restantes regiões verificou-se a presença de ambas as estirpes, sendo que a estirpe Europeia apresentou sempre maior prevalência do que a estirpe Americana.

É de salientar que as amostras oriundas da zona do Alentejo eram provenientes de animais com idades compreendidas entre as 4 e as 8 semanas, apresentando a existência de anticorpos maternos, que terão originado os resultados positivos.

A região do Algarve devido à pouca densidade de animais presentes na região não é clara no que alude a presença de PRRSV na região, pois das amostras analisadas apenas uma apresentou resultados positivos para a presença de PRRSV.

Após a avaliação dos *kits* utilizados concluiu-se que o *kit* IDEXX PRRS X3 é mais sensível e específico para a deteção de anticorpos do que o *kit* Civtest E/S.

Concluiu-se que existe uma limitação ao diagnóstico de PRRS porque os *kits* comerciais existentes no mercado não efetuam a diferenciação entre anticorpos virais e vacinais. Futuramente poderá existir por parte da produção suinícola pressão para que os laboratórios fabricantes de *kits* comerciais produzam *kits* que efetuem somente o diagnóstico do PRRSV permitindo uma maior eficácia na deteção do vírus nas explorações.

A análise realizada por RT-PCR apesar de ser considerada mais eficiente que a análise realizada através do método ELISA, também apresenta como principal desvantagem a não diferenciação do tipo de RNA detetado (vacinal ou viral). O tipo de amostra e o número de amostras por *pool* também representam limitações à qualidade do teste realizado. Num futuro próximo irá existir a necessidade da diferenciação do RNA nas amostras, para isso o desenvolvimento dos *kits* comerciais para RT-PCR poderá assentar na diferenciação entre a estirpe vacinal e a estirpe clínica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albina E, V. P. (1994). Persistence of the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress*, p. 53.
- Allende R, L. T. (1999). North American and European Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virology*, 307-15, 80.
- Allende R, L. T. (2000). Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch Virology*, 145, 1149-61.
- Arias, M. B.-V. (n.d.). *Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino*. Retrieved from <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/patogenia.html>
- Bane DP, H. W. (1990). Fumonisin as a predisposing factor for "Mystery Swine Disease" . 77-79. Denver, Colorado: Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting, Livestock Conservation Institute .
- Baron T, A. E. (1992). Report on the first outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France: Diagnosis and viral isolation. 23: 161-166. *Ann Rech Vet*.
- Benfield D A, C. -H. (1997). Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Proceedings of the 28th Annual Meeting American Association Swine Practitioners*, pp. 455-458.
- Benfield DA, N. E. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (Isolate ATCC VR2332). *J Vet Diagn Invest*, 4, 127-33.
- Bloemraad M, d. K. (1994). Porcine Reproductive and respiratory syndrome: Temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs . *Vet Microbiology*, 42, 361-71.
- Botner A, N. J.-H. (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. 40:351-360. *Vet Microbiol*.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. 142:629-633. *Arch. Virol*.
- Chang CC, C. W. (1993). Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in Taiwan. *J Viral Isolation*, 19:268-276. *J Chin Soc. Vet Sci*.
- Chris J. Nelseen, M. P. (1999). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Comparison: Divergent Evolution on two Continents. 73 nº1.
- Christianson WT, C. J. (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res*, 53, 485-488.

- Christopher-Hennings J, N. E. (1995). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiology*, 33, 1730-4.
- DC, H. (1990). Mystery Swine Disease. *94:501-504*. Proc US Anim Health Assoc .
- De Jong MF, V. V. (1991). The epidemiology of PRRS in the Netherlands. *PRRS (The new pig disease) A reporter for seminar held in Brussels on 4-5 November 1991 and organized by the European Commission (Directorate General for Agriculture)*, 2-7.
- Dea S, B. R. (1992a). PRRS Syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus (letter). *130:167*. Vet Rec.
- Dea S, B. R. (1992b). Swine Reproductive and respiratory syndrome in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *33:801-808*. Can Vet J.
- Dea S, B. R. (1992c). PRRS in Quebec: virology and pathologic aspects. *4:2-7*. American association of Swine Practitioners Newsletter.
- Dee S, D. J. (2002 a). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome33. *Can J Vet Res*, 66, 232-239.
- Dee S, D. J. (2002b). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can J Vet Res* , (in press).
- Den Boon, J. A. (1991). Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronavirus like superfamily. *65:2126-2132*.
- Directiva comunitária, J. L. (1991). Relativa a determinadas medidas de protecção contra a « nova » doença dos suínos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 30-31.
- Duan X, N. H. (1997). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes / macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch virology*, 142, 2483-87.
- Edwards S, R. I. (1992). PRRS ("blue-eared pig disease") in Great Britain. *4:32-36*.
- Elazhary Y, W. J. (1992). "Mystery Swine Disease" in Canada. *129:495-496*. Vet Rec.
- Eric J. Snijder, 1. M. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *94, 2141–2163*.
- Eric J. Snijder, M. K. (2013). Arterivirus molecular biology pathogenesis. *94, p 2141-2163*.
- Fang, Y. T. (2012). Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *109, E2920–2928*.
- Feitsma H, G. H. (1992). The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*.
- Galina C., P. C. (1992). Interaction between PEARS and Streptococcus suis of different protein phenotypes. *Proceedings 12th IPVS Congress*. Hague.

- Godeny, E. K. (1998). Identification of the leader-body junctions for the viral subgenomic mRNAs and organization of the simian hemorrhagic fever virus genome: evidence for gene duplication during arterivirus evolution. *Journal of virology*, 72:862-867.
- H, H. (1990). Overview and history of "Mystery swine disease" (Swine infertility / respiratory syndrome). 29-31. Denver, Colorado: Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting, Livestock Conservation Institute.
- Halbur P.G., P. P. (1996). Reproduction of proliferative interstitial pneumonia (PIP) and myocarditis with tissue filtrates from a case of endemic pneumonia in nursery pigs. *Proceedings 12th IPVS Congress*. Hague.
- Haynes JS, H. P. (1997). Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. *Vet Pathol*, 34, 39-43.
- Hirose O, K. H. (1995). Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chiba prefecture. 48:650-653. *J Jpn Vet Med Assoc*.
- Hopper SA, W. M. (1992). An outbreak of blue eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec*, 131, 140-4.
- Horter DC, P. R., & Chang CC, E. R. (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiology*, 86, 3213-8.
- HS, J. (1988). EMC virus causes poor reproduction. 12:23-34. *Int Pigletter*.
- Hulo C, d. C. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Suiça*.
- J, Z. (2003). Historical Overview of PRRS Virus. *chapter one*. Compendium Producer Edition.
- Jane Christopher-Hennings, D. M. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Journal of Swine Health and Production*, 213-218.
- JM, P. C. (2005). Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar. *Theriogenology*, 63, 1-16.
- Joo HS, C. B. (1990). Encephalomyocarditis virus as a potential cause for "Mystery swine disease". 62-66. Denver, Colorado: Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting, Livestock Conservation Institute.
- Keffaber K, S. G. (1992). SIRS virus infection in nursery \grower pigs. *ASSP International PRRS symposium edition*.
- K-J Yoon, J. C.-H. (2003). Diagnosis of PRRS Virus.
- Kobayashi, H. M. (1996). Mycoplasma hyorhinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *J Vet Med Sci*, 58, 109-113.
- Kousuke H, Y. S. (2005). The origin and Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. 22 *n^o4*. *Molecular Biology and Evolution*.

- Kowijn, R., & Van Klink, E. e. (1996). The possible effect of weather conditions on the spread of the new pig disease in the Netherlands. NEW PIG DISEASE. Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome. *EEC Seminar*. Brussels.
- Kreutz, L. C. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome: a Brief review. *Ciencia Rural*, 28.
- Lager KM, M. W. (1995). Pathogenesis of in utero infection in porcine reproductive and trespriatory syndrome virus. *Can J. Vet Res*, 59, 187-92.
- Lager KM, M. W. (1996). Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet Rec*, 138, 227-8.
- Lager KM, M. W. (1997). Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* , 58, 113-125.
- Lauck, M. S. (2013). Exceptional simian hemorrhagic fever virus diversity in a wild African primate communit. *Journal of virology*, 87:688-691.
- Luque, I. D. (2006). Caracterización de la respuesta Inmune de lechones durante la infección y tras la vacunación con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Universitat Autònoma de Barcelona: Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals .
- MacLachlan James N, D. E. (2011). Fenner's Veterinary Vitology fourth edition. *Chapter 25:415-421*.
- Mec, W. (1992). The clinical signs and symptoms of "blue eared pig disease". *Pig Vet J*, 28, 62-8.
- Mengeling WL Lager KM, V. A. (1994). Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res*, 55, 1391-1398.
- Oleskiewicz, M. E. (2004). Phae display of the equine arteritis virus nsp1 SF domain and exmination of its metal interactions. *119:159169*.
- Otake S, D. S. (2002a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites. *J Swine Health Prod*, 10(2), 59-65.
- Otake S, D. S. (2002b). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet Rec*, 150, 114-115.
- Otake S, D. S. (2002c). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can J Vet Res* , 66, 191-195.
- Otake S, D. S. (2002d). Evaluation of mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies, *Musca domestica* (Linnaeus). *Vet Rec* , (in press).

- Otake S, D. S. (2002e). Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Vet Rec*, 150, 804-808.
- Pejsak Z, M. D. (1996). *Viruses as a reason for reproductive failure in Pig herds in Poland* (Vols. 31: 445-447). Repro. Dom Anim .
- Perestrelo Vieira, R. ,. (1998). As Doenças dos suínos. *Publicações Ciência e Vida. 1ª Edição-Lisboa*, 363 - 398.
- Plana DuranJ, V. M. (1992). PRRS ("Mystery Swine Disease") - summary of the work conducted by our group. 4:16-18. American Association of swinw Practitioners Newsletter.
- Prieto C, G. C. (2003). Temporal Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenology*, 60, 1505-14.
- Prieto C, S. P. (1997). Transplacental infection following exposure of gifts to porcine reproductive syndrome virus at the onset of gestation. *Vet Microbiology*, 57, 301 - 311.
- R., R. (1989). Swine reproductive failure syndrome mystifies scientists. 195:425-428. J Am Vet Med Assoc.
- Rossow KD, B. D.-H. (1996). Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol*, 33, 551-6.
- Rossow KD, B. E. (1994). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one, four, and 10 week old pigs. *J Vet Diagn Invest*, 6, 3-12.
- Rossow KD, C. J.-H. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnobiotic pigs. *Vet Pathol*, 32, 361-73.
- Rossow KD, s. J. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterized by marked neurovirulence. *Vet Rec*, 144, 444-8.
- Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Veterinary Pathology* , 35(Diagnosis PRRSV), 20.
- Rowland RR, S. M. (1999). The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quaispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology*, 259, 262-6.
- SM, G. (1993). Porcine Reproductive and respiratory syndrome . *J Vet Diagn Invest*, 5, 656-64.
- Snijder EJ, M. J. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virology*, 79, 961 - 79.
- Sur JH, C. V. (1996). In vivo detection PRRS virus RNA by in situ hybridization at different times potinfection. *J Clin Microbiology*, 34, 2280-6.

- Swenson SL, H. H. (1994). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J AM Vet Med Assoc*, 204, 1943-8.
- T, L. (1991). Mystery pig disease. *Agri Prac*, 12, 23-24.
- T, L. (1991). Mystery pig disease. *Agri Prac*, 12, 23-34.
- T., Q. (1989). Scramble is on to solve Mystery disease. *july 5-10*. Swine Pract.
- Terpstra C, W. G. (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus. *Koch's postulates fulfilled*, 13:131-136. Vet Q.
- Thanawongnuwech R, T. E. (1998). Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)- infected pulmonary intravascular macrophages (PIMs). *Vet Microbiology*, 63, 177-87.
- Valiček L, P. e. (1997). Isolation and Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in cell culture. 42:281-287. Vet Med (Praha).
- Van Alstine WG, P. M. (2002). Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. *J Vet Diagn Invest*, 14, 504-7.
- Van Reeth, K. N. (1996). Dual infection of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microb*, 48.
- W.G., V. A. (1996). Past diagnostic approaches and findings and potentially useful diagnostic strategies. Proceedings of Mystery Swine Disease. *Committee Meeting*. Denver, Colorado.
- Wagstrom EA1, C. C. (2001). Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am J Vet*, 62, 1876-1880.
- Weiland E, W.-k. M. (1999). Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiology*, 66, 171-86.
- Wensvoort G, T. C. (1991). Mystery Swine Disease in the Netherlands: isolation of Lelystad virus. 13:121-130. Vet Q.
- William T. Christianson, D. P., & Han Soo Joo, D. P. (1994). Porcine Reproductive and respiratory syndrome: A review. *Swine Health and Production*, 10-28.
- Wills RW, D. A. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiology*, 41, 58-62.

- Wu WH, F. Y.-b.-H. (2001). A 10-Kda structural protein of porcine resporductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF 2b . *Virology*, 287, 183-91.
- Wu WH, F. Y.-H. (2005). The 2b Protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res*, 114, 177-81.
- Yaeger MJ, P. T.-H. (1993). Evidence for the transmission of Porcine Reproductive and Respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine health and Production*, 1, 7-9.
- Yoon K. J., Z. J. (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7, 305-312.
- Yuna S, F. X. (2009). Crystal Structure of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Leader Protease Nsp1. 83 n° 21, P. 10931-10940.
- Zimmerman JJ, B. D. (2006). Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine arterivirus). In *Diseases of swine 9th edition* (pp. 387-416). IOWA: Straw BA, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. .
- Zimmerman, J. e. (2003). Epidemiology and Ecology. *PRRS compendium PRRS Edition*, 4, 26-34.

7. ENDEREÇOS CONSULTADOS

<http://www.qiagen.com/pt/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/viral-rna/qiaamp-viral-rna-mini-kit/#orderinginformation> (consultado a 28 Janeiro de 2014)

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/prrs/> (consultado a 4 Outubro de 2013)

<http://www.thepigsite.com/diseaseinfo/> (consultado a 6 de Outubro de 2013)

http://www.igfse.pt/st_glossario.asp?startAt=2&categoryID=309 (consultado a 30 de Setembro 2013)

<http://www.ine.pt/> (consultado a 30 de Setembro de 2014)

<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=5686039&generico=5849894&cboui=5849894>
(consultado a 29 de Setembro de 2013 e 20 Março de 2014)

ANEXOS

Anexo A: Leituras ELISA

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Norte	1	8S	0,086	0,066	Negativo	0,2124	5,80	Negativo	0,269	-6,138	Negativo
	2	8S	0,106	0,097	Negativo	0,3590	18,08	Negativo	0,334	-2,919	Negativo
	3	8S	0,110	0,103	Negativo	0,4647	26,93	Positivo	0,344	-2,444	Negativo
	4	8S	0,082	0,059	Negativo	0,1966	4,48	Negativo	0,224	-8,370	Negativo
	5	8S	0,080	0,056	Negativo	0,6584	43,15	Positivo	0,346	-2,311	Negativo
	6	12S	0,053	0,016	Negativo	0,1348	-0,70	Negativo	0,260	-6,588	Negativo
	7	12S	0,050	0,011	Negativo	0,1714	2,37	Negativo	0,572	8,825	Negativo
	8	12S	0,079	0,054	Negativo	0,2516	9,09	Negativo	0,248	-7,165	Negativo
	9	12S	0,087	0,068	Negativo	0,7103	47,50	Positivo	0,350	-2,104	Negativo
	10	12S	0,219	0,270	Negativo	0,2470	8,72	Negativo	0,319	-3,654	Negativo
	11	Reprodutora	0,302	0,397	Negativo	0,8150	56,23	Positivo	0,288	-5,185	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Alentejo	1	4S	1,178	3,126	Positivo	1,4947	113,19	Positivo	0,529	6,711	Negativo
	2	4S	0,596	1,516	Positivo	1,1257	82,29	Positivo	0,560	8,222	Negativo
	3	4S	1,585	4,255	Positivo	1,6392	125,29	Positivo	0,395	0,099	Negativo
	4	4S	1,146	3,040	Positivo	0,7293	49,09	Positivo	0,360	-1,640	Negativo
	5	4S	1,800	4,852	Positivo	1,0077	72,41	Positivo	1,713	65,170	Positivo
	6	4S	1,690	4,546	Positivo	1,2891	95,97	Positivo	0,707	15,486	Negativo
	7	4S	1,860	5,015	Positivo	3,4922	280,47	Positivo	2,546	106,321	Positivo
	8	4S	1,627	4,371	Positivo	2,6893	213,23	Positivo	1,270	43,328	Positivo
	9	4S	1,650	2,461	Positivo	2,2169	173,67	Positivo	0,491	4,859	Negativo
	10	4S	1,430	2,125	Positivo	3,1422	251,16	Positivo	1,877	73,264	Positivo
	11	4S	1,122	1,653	Positivo	0,5998	38,25	Positivo	0,379	-0,706	Negativo
	12	4S	1,607	2,396	Positivo	1,7484	134,44	Positivo	1,717	65,363	Positivo
	13	4S	1,497	2,226	Positivo	0,8490	59,12	Positivo	0,811	20,652	Positivo
	14	4S	1,515	2,255	Positivo	1,8189	140,34	Positivo	1,603	59,728	Positivo
	15	5S	0,265	0,597	Positivo	0,1315	-0,97	Negativo	0,231	-7,985	Negativo
	16	5S	1,323	3,528	Positivo	0,1779	2,91	Negativo	0,269	-6,138	Negativo
	17	5S	1,304	3,476	Positivo	0,1483	0,44	Negativo	0,424	1,516	Negativo
	18	5S	0,749	1,938	Positivo	0,1997	4,74	Negativo	0,271	-6,010	Negativo
	19	5S	1,190	3,160	Positivo	0,2619	9,95	Negativo	0,451	2,869	Negativo
	20	5S	1,597	2,380	Positivo	2,3054	181,08	Positivo	1,419	50,652	Positivo
	21	5S	1,698	2,535	Positivo	2,6933	213,57	Positivo	1,486	53,980	Positivo
	22	5S	1,501	2,232	Positivo	2,3638	185,97	Positivo	1,052	32,533	Positivo
	23	5S	1,848	2,764	Positivo	2,4220	190,85	Positivo	0,890	24,553	Positivo
	24	5S	1,357	2,012	Positivo	1,2004	88,54	Positivo	0,541	7,289	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Alentejo	25	8S	1,369	3,657	Positivo	0,1488	0,48	Negativo	0,271	-6,044	Negativo
	26	8S	0,802	2,084	Positivo	0,1592	1,35	Negativo	0,347	-2,262	Negativo
	27	8S	0,849	2,216	Positivo	1,5642	119,01	Positivo	0,357	-1,802	Negativo
	28	8S	1,185	3,146	Positivo	0,9126	64,44	Positivo	0,351	-2,094	Negativo
	29	8S	1,129	2,993	Positivo	0,5223	31,76	Positivo	0,332	-3,027	Negativo
	30	8S	0,853	2,228	Positivo	2,0807	162,26	Positivo	0,789	19,541	Negativo
	31	8S	0,767	1,988	Positivo	0,8654	60,49	Positivo	0,443	2,469	Negativo
	32	8S	0,483	1,202	Positivo	0,6636	43,59	Positivo	0,505	5,536	Negativo
	33	8S	0,474	1,178	Positivo	0,1771	2,85	Negativo	0,212	-8,928	Negativo
	34	8S	0,435	1,068	Positivo	0,1922	4,11	Negativo	0,289	-5,146	Negativo
	35	8S	0,770	1,998	Positivo	0,1602	1,43	Negativo	0,389	-0,202	Negativo
	36	8S	1,077	2,849	Positivo	0,1830	3,34	Negativo	0,390	-0,128	Negativo
	37	8S	0,856	2,235	Positivo	0,1543	0,94	Negativo	0,272	-5,956	Negativo
	38	8S	0,674	1,732	Positivo	0,4029	21,76	Positivo	1,320	45,778	Positivo
	39	8S	1,170	3,104	Positivo	0,2195	6,40	Negativo	0,413	0,988	Negativo
	40	8S	1,175	1,734	Positivo	1,7782	136,93	Positivo	0,404	0,538	Negativo
	41	8S	1,419	2,107	Positivo	1,3600	101,91	Positivo	0,915	25,753	Positivo
	42	8S	1,230	1,817	Positivo	0,6007	38,32	Positivo	0,339	-2,647	Negativo
	43	8S	0,698	1,004	Positivo	0,7360	49,65	Positivo	0,505	5,516	Negativo
	44	8S	0,830	1,206	Positivo	0,7974	54,79	Positivo	0,485	4,519	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Alentejo	46	12S	0,318	0,744	Positivo	0,1626	1,63	Negativo	0,252	-6,958	Negativo
	47	12S	0,845	2,205	Positivo	0,1330	-0,85	Negativo	0,164	-11,309	Negativo
	48	12S	0,230	0,502	Positivo	0,1326	-0,88	Negativo	0,229	-8,079	Negativo
	49	12S	0,373	0,897	Positivo	0,1812	3,19	Negativo	0,199	-9,570	Negativo
	50	12S	0,386	0,525	Positivo	0,2482	8,80	Negativo	0,266	-6,262	Negativo
	51	12S	1,266	1,872	Positivo	0,3153	14,42	Negativo	0,454	3,012	Negativo
	52	12S	1,483	2,206	Positivo	0,1665	1,96	Negativo	0,965	28,247	Positivo
	53	12S	1,182	1,744	Positivo	0,6805	45,00	Positivo	0,449	2,756	Negativo
	54	12S	0,374	0,507	Positivo	1,1878	87,49	Positivo	0,870	23,531	Positivo
	55	16S	0,294	0,679	Positivo	0,1441	0,08	Negativo	0,264	-6,375	Negativo
	56	16S	0,317	0,742	Positivo	0,1292	-1,16	Negativo	0,167	-11,156	Negativo
	57	16S	0,595	1,513	Positivo	0,1257	-1,46	Negativo	0,169	-11,072	Negativo
	58	16S	0,143	0,261	Negativo	0,1383	-0,40	Negativo	0,190	-10,040	Negativo
	59	16S	0,573	1,451	Positivo	0,1917	4,07	Negativo	0,200	-9,546	Negativo
	60	24S	0,061	0,033	Negativo	1,4645	110,678	Positivo	0,895	24,800	Positivo
	61	24S	0,263	0,592	Positivo	1,0811	78,568	Positivo	1,107	35,249	Positivo
	62	24S	1,525	2,270	Positivo	0,2187	6,33	Negativo	0,457	3,156	Negativo
	63	24S	0,392	0,535	Positivo	0,1214	-1,82	Negativo	0,328	-3,200	Negativo
	64	24S	0,334	0,445	Positivo	0,3420	16,66	Negativo	0,303	-4,459	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Alentejo	65	Reprodutora	0,118	0,190	Negativo	0,1643	1,784	Negativo	0,296	-4,775	Negativo
	66	Reprodutora	0,163	0,314	Negativo	0,1297	-1,12	Negativo	0,346	-2,346	Negativo
	67	Reprodutora	0,147	0,271	Negativo	0,0990	-3,69	Negativo	0,265	-6,301	Negativo
	68	Reprodutora	0,074	0,047	Negativo	0,1498	0,56	Negativo	0,592	9,802	Negativo
	69	Reprodutora	0,168	0,192	Negativo	0,3013	13,25	Negativo	1,414	50,430	Positivo
	70	Reprodutora	0,371	0,503	Positivo	0,1711	2,34	Negativo	0,343	-2,494	Negativo
	71	Reprodutora	0,119	0,116	Negativo	0,2306	7,33	Negativo	0,477	4,143	Negativo
	72	Reprodutora	0,171	0,196	Negativo	1,7782	136,93	Positivo	1,652	62,178	Positivo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Centro	1	9S	0,374	0,507	Positivo	0,1498	0,570	Negativo	0,870	23,531	Positivo
	2	9S	0,334	0,445	Positivo	0,3013	13,258	Negativo	0,303	-4,459	Negativo
	3	9S	0,074	0,047	Negativo	0,1711	2,353	Negativo	0,592	9,802	Negativo
	4	9S	0,168	0,192	Negativo	0,2306	7,337	Negativo	1,414	50,430	Positivo
	5	9S	0,371	0,503	Positivo	0,2187	6,340	Negativo	0,343	-2,494	Negativo
	6	9S	0,119	0,116	Negativo	0,1214	-1,809	Negativo	0,477	4,143	Negativo
	7	9S	1,525	2,270	Positivo	1,7782	136,951	Positivo	0,457	3,156	Negativo
	8	9S	0,392	0,535	Positivo	0,1254	-1,474	Negativo	0,328	-3,200	Negativo
	9	9S	0,171	0,196	Negativo	0,1348	-0,687	Negativo	1,652	62,178	Positivo
	10	9S	0,165	0,186	Negativo	0,1714	2,379	Negativo	1,712	65,141	Positivo
	11	12S	0,483	0,674	Positivo	0,1922	4,121	Negativo	0,505	5,536	Negativo
	12	12S	0,474	0,660	Positivo	0,1315	-0,963	Negativo	0,212	-8,928	Negativo
	13	12S	0,435	0,600	Positivo	0,1779	2,923	Negativo	0,289	-5,146	Negativo
	14	12S	0,265	0,339	Negativo	0,1483	0,444	Negativo	0,231	-7,985	Negativo
	15	12S	1,323	1,960	Positivo	0,1997	4,749	Negativo	0,269	-6,138	Negativo
	16	12S	0,317	0,419	Positivo	0,1383	-0,394	Negativo	0,167	-11,156	Negativo
	17	12S	0,595	0,846	Positivo	0,1917	4,079	Negativo	0,169	-11,072	Negativo
	18	12S	0,143	0,154	Negativo	0,1488	0,486	Negativo	0,190	-10,040	Negativo
	19	12S	0,573	0,811	Positivo	0,1592	1,357	Negativo	0,200	-9,546	Negativo
	20	12S	1,369	2,031	Positivo	1,5642	119,028	Positivo	0,271	-6,044	Negativo
	21	12S	0,607	0,864	Positivo	0,3278	15,477	Negativo	0,302	-4,494	Negativo
	22	12S	0,720	1,036	Positivo	0,1969	4,514	Negativo	0,298	-4,696	Negativo
	23	12S	1,086	1,597	Positivo	1,1188	81,725	Positivo	0,184	-10,331	Negativo
	24	12S	1,385	2,055	Positivo	0,7280	48,995	Positivo	0,223	-8,385	Negativo
	25	12S	0,425	0,586	Positivo	0,2665	10,343	Negativo	0,252	-6,943	Negativo
	26	12S	0,242	0,305	Negativo	0,1912	4,037	Negativo	0,488	4,686	Negativo
	27	12S	0,332	0,443	Positivo	0,1575	1,214	Negativo	0,315	-3,847	Negativo
	28	12S	0,364	0,492	Positivo	0,1626	1,642	Negativo	0,254	-6,889	Negativo
	29	12S	0,159	0,177	Negativo	0,1330	-0,838	Negativo	0,175	-10,765	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Centro	30	15S	1,515	2,255	Positivo	1,3600	101,926	Positivo	1,603	59,728	Positivo
	31	15S	1,175	1,734	Positivo	0,6007	38,333	Positivo	0,404	0,538	Negativo
	32	15S	1,419	2,107	Positivo	0,7360	49,665	Positivo	0,915	25,753	Positivo
	33	15S	1,230	1,817	Positivo	0,7974	54,807	Positivo	0,339	-2,647	Negativo
	34	15S	0,698	1,004	Positivo	0,2482	8,811	Negativo	0,505	5,516	Negativo
	35	15S	0,830	1,206	Positivo	0,3153	14,430	Negativo	0,485	4,519	Negativo
	36	15S	0,386	0,525	Positivo	0,1665	1,968	Negativo	0,266	-6,262	Negativo
	37	15S	1,266	1,872	Positivo	0,6805	45,017	Positivo	0,454	3,012	Negativo
	38	15S	1,483	2,206	Positivo	1,1878	87,504	Positivo	0,965	28,247	Positivo
	39	15S	1,182	1,744	Positivo	0,3420	16,667	Negativo	0,449	2,756	Negativo
	40	16S	1,096	1,613	Positivo	1,4113	106,223	Positivo	0,393	0,015	Negativo
	41	16S	0,248	0,314	Negativo	0,5114	30,854	Positivo	0,254	-6,849	Negativo
	42	16S	0,460	0,639	Positivo	0,6435	41,918	Positivo	0,549	7,694	Negativo
	43	16S	0,466	0,647	Positivo	0,6114	39,229	Positivo	0,178	-10,627	Negativo
	44	19S	1,650	2,461	Positivo	2,6933	213,593	Positivo	0,491	4,859	Negativo
	45	19S	1,597	2,380	Positivo	2,3638	185,997	Positivo	1,419	50,652	Positivo
	46	19S	1,698	2,535	Positivo	2,4220	190,871	Positivo	1,486	53,980	Positivo
	47	19S	1,501	2,232	Positivo	1,2004	88,559	Positivo	1,052	32,533	Positivo
	48	19S	1,848	2,764	Positivo	3,1422	251,189	Positivo	0,890	24,553	Positivo
	49	19S	1,357	2,012	Positivo	0,5998	38,258	Positivo	0,541	7,289	Negativo
	50	19S	1,430	2,125	Positivo	1,7484	134,456	Positivo	1,877	73,264	Positivo
	51	19S	1,122	1,653	Positivo	0,8490	59,129	Positivo	0,379	-0,706	Negativo
	52	19S	1,607	2,396	Positivo	1,8189	140,360	Positivo	1,717	65,363	Positivo
	53	19S	1,497	2,226	Positivo	1,7782	136,951	Positivo	0,811	20,652	Positivo
	54	21S	0,318	0,421	Positivo	0,1326	-0,871	Negativo	0,252	-6,958	Negativo
	55	21S	0,845	1,228	Positivo	0,1812	3,199	Negativo	0,164	-11,309	Negativo
	56	21S	0,230	0,287	Negativo	0,1441	0,092	Negativo	0,229	-8,079	Negativo
	57	21S	0,373	0,505	Positivo	0,1292	-1,156	Negativo	0,199	-9,570	Negativo
	58	21S	0,294	0,385	Negativo	0,1257	-1,449	Negativo	0,264	-6,375	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Centro	59	24S	0,802	1,162	Positivo	0,9126	64,456	Positivo	0,347	-2,262	Negativo
	60	24S	0,849	1,234	Positivo	0,5223	31,767	Positivo	0,357	-1,802	Negativo
	61	24S	1,185	1,749	Positivo	1,4947	113,208	Positivo	0,351	-2,094	Negativo
	62	24S	1,129	1,664	Positivo	1,1257	82,303	Positivo	0,332	-3,027	Negativo
	63	24S	1,178	1,737	Positivo	1,6392	125,310	Positivo	0,529	6,711	Negativo
	64	24S	0,596	0,847	Positivo	0,7293	49,104	Positivo	0,560	8,222	Negativo
	65	24S	1,585	2,361	Positivo	2,0807	162,286	Positivo	0,395	0,099	Negativo
	66	24S	1,146	1,690	Positivo	0,8654	60,503	Positivo	0,360	-1,640	Negativo
	67	24S	0,853	1,241	Positivo	0,6636	43,601	Positivo	0,789	19,541	Negativo
	68	24S	0,767	1,108	Positivo	0,1771	2,856	Negativo	0,443	2,469	Negativo
	69	24S	1,304	1,931	Positivo	0,2619	9,958	Negativo	0,424	1,516	Negativo
	70	24S	0,749	1,081	Positivo	0,1602	1,441	Negativo	0,271	-6,010	Negativo
	71	24S	1,190	1,756	Positivo	0,1830	3,350	Negativo	0,451	2,869	Negativo
	72	24S	0,770	1,114	Positivo	0,1543	0,946	Negativo	0,389	-0,202	Negativo
	73	24S	1,077	1,584	Positivo	0,4029	21,767	Positivo	0,390	-0,128	Negativo
	74	24S	0,856	1,245	Positivo	0,2195	6,407	Negativo	0,272	-5,956	Negativo
	75	24S	0,674	0,967	Positivo	1,0077	72,420	Positivo	1,320	45,778	Positivo
	76	24S	1,170	1,725	Positivo	1,2891	95,988	Positivo	0,413	0,988	Negativo
	77	24S	1,800	2,691	Positivo	3,4922	280,503	Positivo	1,713	65,170	Positivo
	78	24S	1,690	2,522	Positivo	2,6893	213,258	Positivo	0,707	15,486	Negativo
	79	24S	1,860	2,782	Positivo	3,3644	269,799	Positivo	2,546	106,321	Positivo
	80	24S	1,627	2,426	Positivo	2,5039	197,730	Positivo	1,270	43,328	Positivo
	81	24S	1,939	2,903	Positivo	3,2142	257,219	Positivo	2,139	86,217	Positivo
	82	24S	1,743	2,604	Positivo	2,6272	208,057	Positivo	1,070	33,447	Positivo
	83	24S	1,191	1,758	Positivo	0,8686	60,771	Positivo	1,098	34,795	Positivo
	84	24S	1,399	2,076	Positivo	2,2169	173,693	Positivo	1,912	74,998	Positivo
	85	24S	1,594	2,374	Positivo	2,3054	181,106	Positivo	1,132	36,509	Positivo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Centro	86	Reprodutora	0,053	0,016	Negativo	0,2516	9,095	Negativo	0,260	-6,588	Negativo
	87	Reprodutora	0,050	0,011	Negativo	0,7103	47,513	Positivo	0,572	8,825	Negativo
	88	Reprodutora	0,079	0,054	Negativo	0,2472	8,727	Negativo	0,248	-7,165	Negativo
	89	Reprodutora	0,087	0,068	Negativo	0,2124	5,812	Negativo	0,350	-2,104	Negativo
	90	Reprodutora	0,219	0,270	Negativo	0,359	18,090	Negativo	0,319	-3,654	Negativo
	91	Reprodutora	0,086	0,066	Negativo	0,4647	26,943	Positivo	0,269	-6,138	Negativo
	92	Reprodutora	0,106	0,097	Negativo	0,1966	4,489	Negativo	0,334	-2,919	Negativo
	93	Reprodutora	0,110	0,103	Negativo	0,6584	43,166	Positivo	0,344	-2,444	Negativo
	94	Reprodutora	0,082	0,059	Negativo	0,8145	56,240	Positivo	0,224	-8,370	Negativo
	95	Reprodutora	0,080	0,085	Negativo	0,1269	-1,348	Negativo	0,346	-2,311	Negativo
	96	Reprodutora	0,302	0,701	Positivo	0,1319	-0,930	Negativo	0,288	-5,190	Negativo
	97	Reprodutora	0,162	0,314	Negativo	0,1430	0,000	Negativo	0,309	-4,133	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Lisboa e Vale do Tejo	1	12S	0,302	0,397	Negativo	0,8145	56,23	Positivo	0,288	-5,190	Negativo
	2	12S	0,162	0,183	Negativo	0,1430	-0,01	Negativo	0,309	-4,133	Negativo
	3	12S	0,359	0,484	Positivo	0,3079	13,80	Negativo	0,544	7,432	Negativo
	4	12S	0,435	0,601	Positivo	0,1835	3,38	Negativo	0,682	14,257	Negativo
	5	12S	0,322	0,427	Positivo	0,3982	21,36	Positivo	1,950	76,869	Positivo
	6	16S	0,103	0,092	Negativo	0,4061	22,02	Positivo	1,426	50,993	Positivo
	7	16S	0,597	0,848	Positivo	0,3205	14,86	Negativo	0,741	17,160	Negativo
	8	16S	0,272	0,350	Negativo	0,1792	3,02	Negativo	0,427	1,689	Negativo
	9	16S	0,103	0,151	Negativo	0,4061	22,035	Positivo	1,426	50,993	Positivo
	10	16S	0,597	1,517	Positivo	0,3205	14,866	Negativo	0,741	17,160	Negativo
	11	20S	0,272	0,617	Positivo	0,1792	3,032	Negativo	0,427	1,689	Negativo
	12	20S	0,263	0,592	Positivo	0,6017	38,417	Positivo	0,675	13,941	Negativo
	13	20S	0,118	0,190	Negativo	0,2468	8,693	Negativo	0,527	6,607	Negativo
	14	20S	0,163	0,314	Negativo	0,1297	-1,114	Negativo	0,346	-2,346	Negativo
	15	20S	0,147	0,271	Negativo	0,0990	-3,685	Negativo	0,265	-6,301	Negativo
	16	24S	0,065	0,043	Negativo	0,1673	2,035	Negativo	0,235	-7,788	Negativo
	17	Reprodutora	0,063	0,037	Negativo	0,1425	-0,042	Negativo	0,293	-4,938	Negativo
	18	Reprodutora	0,062	0,035	Negativo	0,2313	7,395	Negativo	0,338	-2,701	Negativo

Identificação amostras / kits ELISA			IDEXX X3			Civtest estirpe Europeia			Civtest estirpe Americana		
Região	Nº de Amostra	Idade em semanas	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado	DO	S/P	Resultado
Algarve	1	12 S	0,359	0,860	Positivo	0,3079	13,811	Negativo	0,544	7,432	Negativo
	2	12S	0,435	1,070	Positivo	0,1835	3,392	Negativo	0,682	14,257	Negativo
	3	12S	0,322	0,757	Positivo	0,3982	21,374	Positivo	1,950	76,869	Positivo

ANEXO II – Bulas Kits Serologia

Resumo do procedimento do teste
 Recomenda-se enfaticamente ler as instruções completas, cuidadosamente, antes de realizar o teste pela primeira vez.

Etapa	Ação
1. Preparo dos reagentes	O concentrado de lavagem deve atingir 18–26°C e ser homogeneizado para dissolver quaisquer sais precipitados. O concentrado de lavagem deve ser diluído 10 vezes (1/10) em água destilada ou deionizada antes do uso (p.ex. 30 ml de concentrado em 270 ml de água por placa de teste).
2. Preparo das amostras	Diluir as amostras a serem testadas 40 vezes (1/40) com o diluente de amostra (p.ex. com 5 µl de amostra, adicione 195 µl de diluente). OBSERVAÇÃO: NÃO DILUA OS CONTROLES. Troque as pontaliras ao manusear amostras diferentes. As amostras devem ser bem misturadas antes de serem colocadas na placa imprregnada.
3. Distribuição das Amostras e Controles	Distribuir 100 µl de controle negativo NÃO DILUÍDO nas cavidades apropriadas, em duplicata. Distribuir 100 µl de controle positivo NÃO DILUÍDO nas cavidades apropriadas em duplicata. Distribuir 100 µl da amostra diluída nas cavidades apropriadas, empregando uma pipetina diferente para cada amostra.
4. Incubação da Amostra	Incubar por 30 minutos (±2 min.) à 18–26°C.
5. Lavagem da Placa	Aspirar o conteúdo líquido de todas as cavidades e descartar em reservatório apropriado. Lavar bem cada cavidade (3 a 5 vezes) com cerca de 300 µl de solução de lavagem. Após cada lavagem, aspirar o conteúdo líquido de cada cavidade. Evitar que as placas sequem entre as lavagens e antes da adição do conjugado. Após a última aspiração da solução de lavagem, remover o líquido residual batendo cuidadosamente, porém com firmeza a placa sobre material absorvente.
6. Distribuição do conjugado	Distribuir 100 µl de conjugado em cada cavidade.
7. Incubação do Conjugado	Incubar por 30 minutos (±2 min.) à 18–26°C.
8. Repita a etapa 5	
9. Distribuição do substrato	Distribuir 100 µl do Solução do substrato TMB em cada cavidade.
10. Incubação do substrato	Incubar por 15 minutos (±1 min.) à 18–26°C.
11. Parando a reação	Distribuir 100 µl de solução de interrupção em cada cavidade da placa de teste para interromper a reação.
12. Leitura da placa	Medir e anotar os resultados de A(550) para as amostras e os controles. Calcular os resultados.
13. Interpretação	Se a relação A/P for menor que 0,40, a amostra é classificada como NEGATIVA para anticorpos anti-SRRS. Se a relação A/P for igual ou superior a 0,40, a amostra é classificada como POSITIVA para anticorpos anti-SRRS.

* IDEXX e Test With Confidence são marcas ou marcas registradas de IDEXX Laboratories Inc. ou de suas filiais nos Estados Unidos e/ou em outros países.
 Informações sobre patentes: idexx.com/patents.

IDEXX PRRS X3 - 17

ANEXO II.1 – Bula kit PRRS IDEXX PRRS X3

Principle of Test

The CIVTEST[®] Suis PR18 AG is an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The specific antigen of *Proctos Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) is coated on the well plates. Upon incubation of the sample in the test well, antibodies specific to PRRSV bind with the coated antigen and remains in the well after washing of the unbound material. Then a conjugated is added that binds only to the antibody. After that, unbound conjugate is washed away and a peroxidase-specific chromogenic substrate is added. The colour appearing in each well is proportional to the amount of serum antibody specific to PRRSV present in the diluted sample.

Kit Composition (enough for 480 test)

Product	Quantity
96 well microplates (in eight well strips) coated with the specific PRRSV antigen	5
Vial N°1: Washing Solution (pH 7.4)	1x100 ml
Vial N°2: Sample Diluent Solution (pH 7.4) containing green dye	100 ml
Vial N°3: Conjugate Solution: MAb anti-protein GP24/PRRSV conjugate solution ready to use containing the dye	30 ml
Vial N°4: Stop Solution: TMB solution ready to use	30 ml
Vial N°5: STOP Solution: H ₂ O ₂ solution ready to use	30 ml
Vial N°6: Positive Control: Positive Control Serum pre-diluted containing yellow dye. Ready to use	2.2 ml
Vial N°7: Negative Control: Negative Control Serum pre-diluted containing blue dye. Ready to use	2.2 ml
Microplate adhesive cover	5
Kit read.	1
Certificate of analysis	1

The preservative used in the liquid reagents is a mixture of methylisothiazolone and benzothiazolone.

WARNINGS: IRRITANT (but not provided).
437 °C; Irritant, precision single and for multichannel pipettes with disposable pipette tips, tubes or dilution plates for diluting samples, 96-well plate reader, distilled or deionised water and plate-washing device.

Precautions for Users

Cautiously read this kit insert. Store all reagents between +2 and +8 °C (do not freeze). Unused aliquots must be stored between +2 and +8 °C sealed twice the plastic bag with silica gel as moisture can damage the plates. Even though the antigen has been inactivated during the manufacturing process, the antigen-coated plates should be treated as a potential source of PRRSV. Do not expose substrate solution to strong light or any oxidising agents. TMB substrates are very sensitive even to trace levels of contamination and should not be returned to the bottle after use. Approximately 25% overage is supplied to allow the removal of a plate over the shelf-life requirements. Do not use components past expiry date and do not intermix components from lots with different lot numbers. Careful pipetting and washing throughout the procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Do not pipette by mouth. Use gloves during the process. The stop solution is 20% sulphuric acid, which is corrosive, handle with care. All waste materials must be properly decontaminated prior to disposal. For voluntary use only.

Unopened reagents, correctly stored, are stable until the expiry date printed in the external label.

Test Procedure

A. Reagent Preparation

All reagents must be allowed to come to room temperature before use.

Working Solution (pH 7.4) (Vial N°2): To neutralise add 1 volume of Washing Solution concentrate to 9 volumes of distilled or deionised water (v/v), to prepare 200 ml of neutralised Washing Solution, mix 20 ml of the concentrate solution with 180 ml of distilled or deionised water. We recommend this should be used within 7 days.

Sample Diluent Solution (pH 7.4) (Vial N°3): To neutralise add 1 volume of Sample Diluent Solution concentrate to 9 volumes of distilled or deionised water (v/v), to prepare 10 ml of neutralised Sample Diluent Solution, mix 20 ml of the concentrate solution with 40 ml of distilled or deionised water. We recommend this should be used within 2 days.

Note: Crystals may form in the washing and sample diluent solutions due to the high concentration of salts. If neutralising the whole volume, the buffer should always be reconstituted prior to the next use. If reconstituting only a portion of the volume, the crystals should not be allowed to re-dissolve at room temperature or in a 42-43 °C water bath for 10-15 minutes. To avoid crystal formation in the concentrated 10x wash solution it can be stored at room temperature after the first precipitated resuspension.

B. Sample Preparation

Positive and negative controls are ready to use and do not require dilution. The rest of the samples must be diluted 1:200 in reconstituted Sample Diluent Solution. A round bottomed 96-well plate (white plates) are available together with multi-channel 5 µl pipette the following 3-step dilution protocol is recommended. First dilute 5 µl of sample in 15 µl of reconstituted Sample Diluent Solution pipetting each sample in the dilution plate, and then transfer 5 µl of the 1:20 diluted sample to the ELISA well into which has previously been pipetted 45 µl of reconstituted Sample Diluent Solution.

C. Test Development

- Allow the reagents to come to room temperature and ensure adequate mixing by swirling or inversion.
- Record sample and optical locations on a 12x8 template sheet. The positive and negative controls must always be run in duplicate.
- Remove the adhesive cover from the plate and add 50 µl of controls and 50 µl of the 1:200 diluted samples to the appropriate wells.
- Cover the plate with the adhesive cover and incubate 60 minutes at +37 °C.
- Remove the adhesive cover and wash the plate 3 times with reconstituted Washing Solution (300 µl per well). Invert and firmly tap dry on absorbent paper.
- Add 50 µl of Conjugate Solution (Vial N°3) to each well.
- Cover the plate with the adhesive cover and incubate 60 minutes at +37 °C.
- Remove the adhesive cover and wash the plate 3 times with reconstituted Washing Solution (300 µl per well). Tap dry as above.
- Add 50 µl of Substrate Solution (Vial N°4) to each well. Shake gently the plate for 2 seconds.
- Develop the chromogenic reaction for 10 minutes at room temperature (+20 - +25 °C) in the dark.
- Add 50 µl of Stop Solution (Vial N°5) to each well. Mix by gently tapping the side of the plate.
- Wipe the under-surface of the plate free of dust etc. with a soft tissue. Read the plate using a Microtiter Plate Reader at 450 nm having first blanked (on air). Record the results.

Reading Results

A. Test Validation

The test is valid if the mean OD₄₅₀ of the Positive Control is > 0.5 and mean OD₄₅₀ of the Positive Control / mean OD₄₅₀ of the Negative Control is > 5.0.

B. Interpretation of Results

For the interpretation of results, an IPRC (Interpretation Index) value is required. The following formula is applied to obtain the IPRC value (using mean OD₄₅₀ values obtained for controls).

$$IPRC = \left[\frac{OD_{450} \text{ Sample} - \text{Mean } OD_{450} \text{ Negative Control}}{\text{Mean } OD_{450} \text{ Positive Control} - \text{Mean } OD_{450} \text{ Negative Control}} \right] \times 100$$

IPRC VALUE	INTERPRETATION
> 20.0	POSITIVE Sample
≤ 20.0	NEGATIVE Sample

[illegible]

Producto	Cantidad
Microplacas de 96 pocillos (divididas en tiras de 8 pocillos) lavadas con antiérgeno específico de <i>Triglopor</i>	5
Vial H1K: Solución de Lavado (TBS)	2x100 ml
Vial H1L: Solución Detergente de Mojarbas (TBS con caseína vegetal)	100 ml
Vial H2L: Solución de Comparación: Solución de HbA en H ₂ O (preparar HbA(0) para usar con colorante rojo)	30 ml
Vial H3L: Solución de Sustrato: Solución de TMB (para usar)	30 ml
Vial H4L: Solución de Pausa: Solución de H ₂ SO ₄ (para usar)	30 ml
Vial H5L: Control Positivo: Suero Control Positivo pre-diluido, con constante conocida. Llevo para la usua.	2,2 ml
Vial H6L: Control Negativo: Suero Control Negativo pre-diluido, con constante anal. Llevo para la usua.	2,2 ml
Cubeta adhesiva para microplaca	5
Instrucciones de uso	1
Certificado de análisis	1

Materiales necesarios para el experimento:
 benceno a 437 °C, prensa de presión (para o multicasal) con sus correspondientes partes, tubos y placas de fondo en U para diseñar las matrices, lecher de placas de ELISA, agua destilada o desionizada y lavante de placas.

Se está elaborando el manual de instrucciones. Contiene a las reacciones entre -2 y $+8$ °C (se congeladas). Conservar las placas no utilizadas entre $+2$ y $+8$ °C, con su cubierta adherida y dentro de la bolsa de plástico con el soporte anti-turbidez. A pesar de que el refrigerante ha sido reemplazado con un refrigerante de tipo R134a, las placas adheridas deben ser conservadas una buena distancia del HFC134a. No exponer la placa adherida a la luz directa o a cualquier radiación. El TMD se may acumule a cualquier medida o contaminación, por lo tanto debe desecharse a la basura una vez usado de este. Se proporcione un 25% de espacio de este reactivo para permitir tener un adecuado flujo de aire. No utilizar las láminas después de la fecha de caducidad. No mezclar las reacciones de las láminas con las láminas de diagnóstico encroce cada vez que se utilizan. No utilizar las placas si la reacción no resultó adecuada después de 10 minutos de incubación con el suero de diagnóstico. Utilizar siempre los guantes antes de todo el proceso. La Solución de Placa contiene ácido salicílico 20 (contorno), manipular con cuidado. Descontaminar todo el material antes de su eliminación. No para este momento.

Las reacciones, sin abrir y convenientemente conservadas, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta exterior de cada placa.

A. Preparación de los reactivos

Reducción de Laramo (116). Para neutralizar al ácido 1 volumen de Solución de Laramo (10a) a 9 volúmenes de agua destilada desionizada (E). Para preparar 200 ml de Solución de Laramo diluir 20 ml de la solución concentrada (10a) con 180 ml de agua destilada o desionizada. 1 a 1 volúmenes de cada se añaden durante 7 días.

Solución Diluyente de Muestras (2a) (Nal. Nº 3): Para accidentalmente añadir 1 volumen de Solución Diluyente de Muestras (3a) a 2 volúmenes de agua destilada o desionizada (E). Para preparar 60 ml de Solución Diluyente de Muestras diluida, mezclar 20 ml de solución concentrada (3a) con 40 ml de agua destilada o desionizada (E). La solución diluida es estable durante 2 días.

B. Preparación de las muestras

C. Desarrollo del ensayo

8. Preparar una hoja de datos para identificar los pozos individuales para cada muestra y control. Los controles positivo y negativo deben siempre analizarse por duplicado.

- ## Lectura de los Resultados

El test es válido si la DD_{neg} media del Control Positivo es $> 0,6$ y la relación DD_{neg} media del Control Positivo es $> 0,6$ y la relación DD_{neg} media del Control Negativo es $> 0,6$ y la relación DD_{neg} media del Control Negativo es $> 0,6$.

Para la interpretación de los resultados se precisa conocer el valor de PP_{95} (figura 2) y el valor de PP_{95} de cada muestra. Para obtener el valor de PP_{95} de cada muestra hay que aplicar la siguiente relación teniendo en cuenta los valores medios de PP_{95} obtenidos con las 2 máquinas de los controladores.

$$RPC = \left[\frac{DO_{\infty} \text{Muestra} - \text{Medis } DO_{\infty} \text{ Control Negativo}}{\text{Medis } DO_{\infty} \text{ Control Positivo} - \text{Medis } DO_{\infty} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

VALOR DE IRPC	INTERPRETACIÓN
> 20,0	Muestra POSITIVA
≤ 20,0	Muestra NEGATIVA

PAROL

Ingene q PRU SYBR
BULL PRU K-SGXVQ

3. AMPLIFICACIÓN

Consideraciones previas a la preparación de la RT-PCR

En cada experimento de RT-PCR además de las muestras problema hay que incluir los siguientes controles:

Control negativo de extracción:

La muestra es substituida por un buffer de elución o agua y es sometido al proceso de extracción de ácidos nucleicos.

Control negativo de RT-PCR:

Incluir todos los reactivos de RT-PCR excepto el ADN, en cuyo lugar se añade agua. Permite comprobar que los reactivos no están contaminados.

Control positivo de PCR o Curva estándar en caso de cuantificación:

Las diluciones de la curva estándar, son un control positivo de PCR de concentración conocida, cuyo resultado debe de ser positivo. Permite comprobar que los primarios y condiciones de RT-PCR elegidos son correctos y que no se ha producido ningún problema en la reacción.

Notas (opcionales):

Para que la cuantificación sea estadísticamente óptima se aconseja realizar 3 réplicas tanto de los puntos de la curva estándar como de las muestras problema, y poder calcular así la desviación estándar con un mínimo de 3 datos.

Preparación de la PCR

- Determinar el nº de reacciones que se van a desarrollar incluyendo los controles.
- Preparar y marcar convenientemente, tantas tubos para la amplificación como muestras vayan a procesarse, añadir un tubo adicional para el control positivo de amplificación, y otro para el control negativo.
- Sacar del congelador el tampón de amplificación, y las mezcla A y B manteniéndolas en hielo picado. Dejar la mezcla B siempre en el hielo picado, mantener a temperatura ambiente el tampón y la mezcla A hasta su total descongelación. Una vez

PAROL

Ingene q PRU SYBR
BULL PRU K-SGXVQ

Tabla 2. Programa de termociclador

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
50	30 min	1
55	30 min	
55	15 seg	40
60	1 min	
55	15 seg	
60	1 min	
95	15 seg	Melting

La lectura de la fluorescencia se realiza en el paso de extensión (enfriado en la fase) y los controles por los que se recoge la fluorescencia de las fluorescencias se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Repartidos y Quemeros

Repartidos y Quemeros	Repartidos	Quemeros
PRUSV	SYBR	Ninguno
Referencia pasiva	ROX	

Tabla 4. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 5. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 6. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 7. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 8. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 9. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 10. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 11. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 12. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 13. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 14. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 15. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 16. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 17. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 18. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 19. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 20. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 21. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 22. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 23. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 24. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 25. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 26. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 27. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 28. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 29. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 30. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 31. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 32. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 33. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 34. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 35. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 36. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 37. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 38. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 39. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 40. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 41. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 42. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 43. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 44. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 45. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 46. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 47. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 48. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+

Tabla 49. validación de los resultados

Color	Muestra problema	Control negativo de PCR	Control positivo de PCR	Resultados
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3				